



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Masteroppgave 2017 60 stp  
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

# **Kitin depolymerisering og selektiv hydrokarbonoksidasjon: enzymatisk foredling av naturressurser**

Chitin depolymerization and selective hydrocarbon  
oxidation: enzymatic processing of natural  
resources

Daniel Gustavsen  
Kjemi

## **Forord**

Denne masteroppgaven ble utført ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) på Ås i perioden januar 2016 – mai 2017.

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder Morten Sørli for muligheten til en masteroppgave i bioorganisk forskningsgruppe, samt god veiledning, fagkunnskap og støtte underveis i prosessen. Medveilederene Anne Grethe Hamre, Bastien Bissaro og Åsmund Kjendseth Røhr fortjener også en stor takk, både for praktisk hjelp på laboratoriet og gode råd under skriveprosessen.

Jeg vil også takke medstudenter, stipendiater og ansatte for et meget godt faglig og sosialt miljø. Til slutt vil jeg takke venner og familie for motivering og støtte underveis i masterprosjektet.

## Sammendrag

Kitin er et polysakkarid bestående av *N*-acetylglukosamin enheter som kobles sammen med  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidbindinger. CBP21, en lytisk polysakkarid monooksygenase (LPMO), bryter glykosidbindinger i kitinpolymeren med en oksidativ mekanisme som fører til mindre krystallinitet. Depolymerisering av  $\beta$ -kitin har blitt forsøkt med og uten forbehandling av substratet med CBP21 for både villtype og aromat til alanin mutanter av kitinasene human chitotriosidase (HCHT) fra menneske og kitinase B (ChiB) fra den gram negative bakterien *Serratia marcescens*. Eksperimenter har blitt utført for ChiB mutantene W220A, W97A/W220A, HCHT-50 mutantene W31A, W99A, W218A, samt isoformen HCHT-39 uten karbohydrat bindende domene. Tidligere studier har vist at aromatiske aminosyrer nærliggende det aktive setet er viktige for grad av depolymerisering, effektiviteten til depolymeriseringen og prosessiviteten. Det er også vist at prosessivitet kan gå på bekostning av effektiviteten til kitinaser. Aromat til alanin mutanter, som er mindre prosessive, har vist seg å være effektive i depolymerisering av mindre krystallinsk kitin.

Resultatene viser at kitinase aktiviteten er høyere på mindre krystallinsk kitin. Effekten av mindre krystallinsk kitin er større for ChiB enn HCHT og større for aromat til alanin mutantene sammenlignet med villtype for både ChiB og HCHT. Tidligere forsøk har vist at ChiB mutanten i subsete +2, W220A, er mer effektiv enn villtype på mindre krystallinsk kitin. Samme resultat observeres for HCHT-50 mutanten W218A som også er posisjonert i subsete +2, men resultatet for HCHT-50 er noe mer usikkert. I forsøk med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direkte tilsatt i reaksjonsblandingen observeres ikke den samme trenden at ChiB W220A er mer effektiv enn ChiB WT med forbehandling av CBP21. For ChiB WT og W220A har også effekten av ulike typer  $\beta$ -kitin blitt undersøkt og kitintypene viser samme trend, men verdien på aktivitetsparametere er ulik. Sammenligning av HCHT-39 WT og HCHT-50 WT viser en øking i kitin depolymerisering med karbohydrat bindende domene.

Hydrokarboner består av atomene karbon og hydrogen. Funksjonalisering i form av kontrollert selektiv oksidasjon av hydrokarboner er en utfordring da produktene har tendens til overoksidasjon og dannelse av CO<sub>2</sub> isteden for verdifulle intermediater. Dagens metanol produksjon er energikrevende og ineffektiv og det er stor kommersiell interesse av en direkte katalytisk rute fra metan til metanol. LPMOer sin evne til selektiv oksidasjon av hydrokarboner har blitt undersøkt basert på likheter i aktiv sete geometri med metan

monooksygenase (MMO) som katalyserer reaksjonen av metan til metanol. Metan, etan, isobutan, sykloheksan og propen ble benyttet som substrater og en rekke ulike reaksjonsbetingelser er forsøkt. Det ble detektert oksiderte produkter av interesse for samtlige substrater og reaksjonsbetingelser. Resultatene viser en gjennomgående trend hvor prøver som inneholder kobber danner høyere konsentrasjon av oksiderte produkter av interesse enn prøver med LPMO.

Hydrogenperoksid er et postulert kosubstrat for LPMOer. Hydrogenperoksid er en sterk oksidant og høye konsentrasjoner kan oksidere og inaktivere enzymer. Glukoseoksidase (GOX) er et enzym som danner hydrogenperoksid fra glukose. In situ generert hydrogenperoksid fra GOX er tenkt å kunne øke aktiviteten til LPMOer under mildere reaksjonsbetingelser. GOX systemet ble optimalisert mot LPMOen CBP21. Resultatene for optimaliseringen er ikke tilsetrekkelige til benyttelse av GOX systemet i forsøk med hydrokarbonoksidasjon eller kitin depolymerisering. Aktivitets økende effekt for CBP21 med hydrogenperoksid generert av GOX observeres.

## Abstract

Chitin is a polysaccharide of *N*-acetylglucosamin units connected through  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glycosidic bonds. CBP21, a lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO), breaks the glycosidic bonds of the chitinpolymer by an oxidative mechanism making it less crystalline. Depolymerisation of  $\beta$ -chitin has been done with and without pre-treatment of the substrate by CBP21 for both the wildtype and aromat to alanine mutants of the chitinases human chitotriosidase (HCHT) from humans and chitinase B (ChiB) from the gram negative bacteria *Serratia marcescens*. Experiments with the ChiB mutants W220A, W97A/W220A, the HCHT-50 mutants W31A, W99A, W218A, and the isoform HCHT-39 without a carbohydrate binding domain have been performed. Previous studies have shown that aromatic amino acids close to the active site are important for degree of depolymerisation, the efficiency of depolymerisation and the processivity. It is also shown that processivity can have a cost in terms of efficiency. Aromat to alanine mutants, that are less processive, are showing high efficiency in depolymerisation of less crystalline substrates.

The result shows that chitinase activity is greater on less crystalline substrate. The effect of less crystalline chitin is greater for ChiB than HCHT and greater for the aromat to alanine mutants compared to the wildtype for both ChiB and HCHT. Previous studies have shown that ChiB with a mutation in subsite +2, W220A, is more efficient than the wildtype on less crystalline chitin. The same result is observed for the HCHT-50 mutant W218A that is also positioned in subsite +2, but there is more uncertainty about result for HCHT-50. The same trend is not observed in experiments with ChiB WT and ChiB W220A with pre-treatment by CBP21 where H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added directly to the reaction mixture. The effect of different kinds of  $\beta$ -chitin has also been tested for ChiB WT and ChiB W220A. The results showing the same trend, but the amount activity observed is different. A comparison of the HCHT-39 WT and HCHT-50 WT shows an increase in chitin depolymerisation with the carbohydrate binding domain.

Hydrocarbons consist of the atoms carbon and hydrogen. Functionalization by controlled selective oxidation of hydrocarbons is challenging because the products have a tendency to over oxidize and produce CO<sub>2</sub> instead of valuable intermediates. Methanol production today is energy intensive and inefficient and a direct route from methane to methanol is of great commercial interest. LPMOs ability to selectively oxidize hydrocarbons has been investigated

based on similarities in active site geometry with methane monooxygenases (MMO) that are catalyzing the reaction methane to methanol. Methane, ethane, isobutane, cyclohexane and propene have been used as substrates and the reactions have been performed under different conditions. The result shows a trend where samples containing copper is producing more oxidized products of interest the samples containing LPMOs.

Hydrogen peroxide is possibly the cosubstrate for LPMOs. Hydrogen peroxide is strongly oxidizing and high concentrations can oxidize and inactivate enzymes. Glucose oxidase (GOX) is an enzyme that produces hydrogen peroxide from glucose. In situ generated hydrogen peroxide by GOX is thought to increase the LPMO activity under milder reaction conditions. The GOX system was optimized towards CBP21. The optimization results were not sufficient enough to use the GOX system in experiments for either hydrocarbon oxidation or chitin depolymerisation. An increase in activity for CBP21 is observed with hydrogen peroxide generated by GOX.

# Innholdsfortegnelse

Forord .....	I
Sammendrag .....	II
Abstract .....	IV
Innholdsfortegnelse .....	VI
Forkortelser .....	X
1 Introduksjon .....	1
1.1 Naturlig forekomst av organisk karbon .....	1
1.2 Karbohydrater .....	1
1.2.1 Kitin og cellulose .....	2
1.2.2 Anvendelser av kitin.....	3
1.3 Hydrokarboner .....	4
1.3.1 Metanol: produksjon og anvendelser .....	4
1.4 Utfordringer med foredling av metan og kitin.....	4
1.5 Lytisk polysakkarid monooksygenase .....	5
1.5.1 Historie og klassifisering .....	5
1.5.2 Struktur og aktivt sete .....	6
1.5.3 Reaksjonsmekanisme .....	7
1.5.4 Elektronoverføring .....	8
1.6 LPMO katalysert hydrokarbonoksidasjon .....	8
1.6.1 CBP21 .....	9
1.6.2 NcLPMO9C .....	10
1.6.3 CelS2 .....	11
1.7 Glykosylhydrolase .....	11
1.7.1 Struktur og virkningsmekanisme .....	12
1.7.2 Kitinaser .....	13
1.8 Kitinolytisk maskineri til <i>Serratia marcescens</i> .....	13
1.8.1 Kitinase B (ChiB).....	14
1.9 Humane kitinaser .....	15
1.10 Substrat assistert mekanisme .....	16
1.11 Aromatiske residuer og prosessivitet.....	17
1.12 Enzym kinetikk: Kostylev og Wilsons modell .....	17

1.13	Glukoseoksidase .....	18
1.14	Mål med oppgaven .....	18
2	Materialer .....	19
2.1	Laboratorieutstyr .....	19
2.2	Programvare til dataanalyse.....	22
2.3	Kjemikalier .....	22
2.4	Proteiner og substrater .....	24
2.5	Bakteriestammer .....	25
2.6	Medier.....	25
2.7	Kit.....	26
2.8	Buffere .....	26
2.9	Løsninger .....	27
3	Metoder .....	28
3.1	Molekylærbiologiske metoder .....	28
3.1.1	Oppdyrking av bakteriestamme.....	28
3.1.2	Isolering av plasmid .....	28
3.1.3	Bestemmelse av DNA konsentrasjon.....	29
3.1.4	Transformering av plasmid inn i TOP10 celler.....	30
3.1.5	Oppdyrking av One Shot® TOP10 <i>E. coli</i> celler.....	30
3.1.6	Isolering av plasmid fra One Shot® TOP10 <i>E. coli</i> celler.....	30
3.1.7	Bestemmelse av DNA konsentrasjon av plasmid isolert fra One Shot® TOP10 <i>E. coli</i> celler.....	31
3.1.8	Transformering av plasmid inn i One Shot® BL21 <i>E. coli</i> celler.....	31
3.1.9	Oppdyrking av One Shot® BL21 <i>E. coli</i> celler .....	31
3.1.10	Tillaging av frysestocker .....	31
3.2	Utrykking av enzymer .....	31
3.2.1	Overekspresjon.....	31
3.2.2	Periplasmatisk ekstrakt.....	32
3.3	Rensing av enzymer.....	33
3.3.1	Rensing av ChiB, Affinitetskromatografi .....	33
3.3.2	Natriumdodecylsulfat polyacrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) .....	34
3.3.3	Rensing av CBP21, Affinitetskromatografi .....	35
3.3.4	Rensing av CelS2, Ionebytterkromatografi med svak anionbytter.....	35
3.3.5	Oppkonsentrering .....	36



3.3.6	Rensing av CelS2, Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC).....	37
3.3.7	Rensing av NcLPMO9C, Ionebytterkromatografi sterk kationbytter .....	38
3.3.8	Rensing av NcLPMO9C, Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) .....	38
3.3.9	Bytte av buffer.....	39
3.3.10	Bestemmelse av proteinkonsentrasjon .....	40
3.3.10.1	A <sub>280</sub> .....	40
3.3.10.2	Bradford .....	41
3.4	Kitin depolymerisering .....	42
3.4.1	Aktivitetsassay .....	42
3.4.2	Metting av LPMOer med Cu <sup>2+</sup> .....	43
3.4.3	Aktivitetsassay med CBP21 .....	44
3.4.4	High performance liquid chromatography (HPLC) .....	44
3.4.5	Dataanalyse .....	45
3.5	Selektiv hydrokarbonoksidasjon.....	45
3.5.1	Aktivitetsassay .....	45
3.5.2	Gasskromatografi (GC).....	48
3.6	In situ generering av H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> med glukoseoksidase.....	49
3.6.1	Aktivitetsassay .....	49
3.6.2	High performance liquid chromatography (HPLC) .....	50
4	Resultater.....	51
4.1	Residuanalyse av HCHT og ChiB .....	51
4.2	Rensing av enzymer.....	51
4.2.1	ChiB .....	51
4.2.2	CBP21 .....	53
4.2.3	CelS2 .....	53
4.2.4	NcLPMO9C .....	55
4.3	Kitin depolymerisering .....	56
4.3.1	Kitinaser fra <i>Serratia marcescens</i> .....	57
4.3.2	Humane kitinaser.....	58
4.4	Selektiv hydrokarbonoksidasjon.....	61
4.4.1	Forsøksoppsett 1 .....	61
4.4.2	Forsøksoppsett 2.....	63
4.4.3	Forsøksoppsett 3.....	64

4.5	In situ generering av H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> med glukoseoksidase .....	65
5	Diskusjon.....	68
5.1	Kitin depolymerisering .....	68
5.1.1	Hastighetsøkende effekt av CBP21, ChiB .....	68
5.1.2	Hastighetsøkende effekt av CBP21, HCHT .....	69
5.1.3	Sammenligning av ChiB og HCHT .....	70
5.2	Selektiv hydrokarbonoksidasjon.....	72
5.3	In situ generering av H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> med glukoseoksidase .....	74
6	Veien videre .....	76
7	Referanser.....	77

## Forkortelser

A	Alanin
AA	Auxiliary activity
A1	<i>N</i> -Acetylglukosamin
A2	<i>N,N</i> '-Diacetylkitobiose
AMCase	Acidic mammalian chitinase
Asp	Aspartat
Cal	Kalori
CBM	Karbohydratbindende domene
CDH	Cellobiosedehydrogenase
ChiA	Kitinase A fra <i>Serratia marcescens</i>
ChiB	Kitinase B fra <i>Serratia marcescens</i>
ChiC	Kitinase C fra <i>Serratia marcescens</i>
C-1	Karbon 1
C-4	Karbon 4
Da	Dalton
DP2ox	oksidert <i>N,N</i> '-diacetylkitobiose
E	Glutamat
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EtOH	Etanol
GC	Gasskromatografi
GC/MS	Gasskromatografi/massespektrometri
GH	Glykosylhydrolase
GOX	Glukoseoksidase
HCHT	Human chitotriosidase
HIC	Hydrofob interaksjonskromatografi
HPLC	High performance liquid chromatography
LPMO	Lytisk polysakkarid monooksygenase
MES	2-( <i>N</i> -morfolin) etansvovelsyre
MMO	Metan monooksygenase
MOF	Metal-organic framework
MOPS	3-( <i>N</i> -morfolin) propansvovelsyre
PMSF	Fenylmetansulfonylfluorid

PSIG	Pounds per square inch gauge
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat polyacrylamid gelelektroforese
SEC	Størrelsesekklusjonskromatografi
Tyr	Tyrosin
W	Tryptofan
WT	Villtype

# 1 Introduksjon

## 1.1 Naturlig forekomst av organisk karbon

Karbon i form av hydrokarboner (naturgass) og strukturelle karbohydrater (cellulose og kitin) finnes i stor mengde i naturen. Årlig blir 140 milliarder m<sup>3</sup> naturgass brent av sikkerhetsmessige årsaker eller på grunn av manglene infrastruktur til transport av gassen. Å omdanne denne gassen til verdifull metanol er et mye bedre alternativ enn å brenne den til ingen nytte og danne mer av klimagassen CO<sub>2</sub> (Munz & Strassner 2015). Årlig biologisk produksjon av kitin i verden er estimert til 10<sup>11</sup> tonn (Tharanathan & Kittur 2003). 80 000 tonn kitin er lett tilgjengelig fra marint avfall som er en stor kilde til kitin (Patil et al. 2000). Dette er viktige naturressurser som finnes i store mengder og kan utnyttes bedre ved omdannelse til produkter av høyere verdi.

Disse store mengdene med metangass kan omdannes til drivstoff eller andre kjemikalier om det hadde vært en direkte rute med selektiv oksidasjon av metan til metanol. Dagens prosedyre med å aktivere C-H bindingen i metan er avhengig av høy temperatur, er dyr og ineffektiv og produserer i tillegg avfall (Balasubramanian et al. 2010).

Naturen har flere løsninger på disse problemene og svarene er enzymer. Aktivering av C-H bindinger i hydrokarboner katalyseres av cytochrome P450 og metan monooksygenaser, mens kitin depolymerisering katalyseres av kitinaser.

## 1.2 Karbohydrater

Karbohydrater de mest tallrike biomolekylene på jorda og fotosyntesen omdanner mer enn 100 milliarder tonn CO<sub>2</sub> og H<sub>2</sub>O om til karbohydrater hvert år. Karbohydrater er organiske forbindelser med generell formel (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> eller derivater av dette og kan inneholde andre grunnstoffer som for eksempel nitrogen, svovel og fosfor. Kjemisk sett er karbohydrater polyhydroksy aldehyder eller ketoner og i vandig løsning vil monosakkarider med fem karboner eller mer innta en syklisk struktur hvor aldehydet eller ketonet reagerer med en av hydroksylgruppene innad i molekylet og danner et hemiacetal eller hemiketal, respektivt.

Monosakkarider som har ulike konfigurasjoner ved hemiacetal eller hemiketal karbonet kalles anomerer og det skiller mellom α og β anomerer.

Disse sykliske strukturene kan kobles sammen med glykosidbindinger som dannes når en hydroksylgruppe på ett sukker reagerer med det anomere karbonet på et annet sukker. Sukkermolekyler kan inngå i glykosidbindinger med ulike hydroksylgrupper. Glykosidbindinger kan følgelig dannes på mange måter og med ulike forgreninger som gir karbohydrater stor strukturell diversitet.

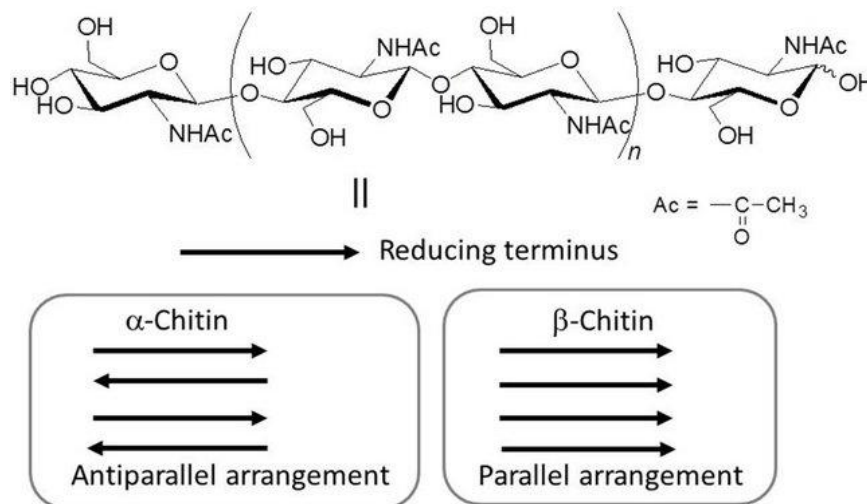
Karbohydrater deles tradisjonelt inn i monosakkarider, oligosakkarider og polysakkarider. Monosakkarider består av en sukkerenhet, mens oligosakkarider består av monosakkarider som er koblet sammen med glykosidbindinger. Det er ikke noe klart skille mellom oligosakkarider og polysakkarider, men sukkerpolymerer som består av mer enn 20 monomerer regnes ofte som polysakkarider.

Oksidering av karbohydrater er sentral energikilde for de aller fleste ikke-fotosyntetiske celler. Polysakkarider har også strukturelle og beskyttende egenskaper i celleveggen til bakterier, leddyr, planter og i bindevev hos mennesker (Nelson & Cox 2008).

### **1.2.1 Kitin og cellulose**

Kitin er en homopolymer av *N*-acetylglukosamin med  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidbindinger uten forgreninger. Monomere er rotert 180 grader i forhold til forrige og neste monomer i polymeren. Kitin består av lineære polysakkaridkjeder som bindes sammen med hydrogenbindinger og danner uløselig krystallinsk kitin. Hoveddelen av eksoskjelettet til leddyr består av kitin. Kitin finnes også i celleveggen til sopp og noen bakterier. Kitin er den nest mest tallrike biopolymeren i naturen. Analog cellulose er den mest tallrike og den eneste kjemiske forskjellen er hydroksylgruppen på karbon 2 i cellulose som er byttet ut med en acetyllert aminogruppe i kitin. Cellulose er følgelig en lineær homopolymer av glukose med  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidbindinger og danner som kitin en uløselig krystallinsk struktur med hydrogenbindinger. I naturen finnes cellulose hovedsakelig i celleveggen til planter. Krystallinsk kitin og cellulose er stabile strukturer og depolymerisering er avhengig av katalyse (Nelson & Cox 2008).

Det finnes hovedsakelig to former av kitin,  $\alpha$  og  $\beta$ . I  $\alpha$ -kitin, som er den vanligste formen, ligger kitinkjedene med direkte naboskap i motsatt retninger av hverandre, mens i  $\beta$ -kitin ligger alle kitinkjedene i samme retning. En tredje form av kitin,  $\gamma$ -kitin, består av et repeterende mønster med to kjeder i en retning etterfulgt av en kjede i motsatt retning.  $\gamma$ -kitin har ikke gjennomgått grundig analyse og er ikke ansett som en etablert form av kitin (Tharanathan & Kittur 2003).



Figur 1.1: Kjemisk struktur av kitin og illustrasjon av kitinkjede organiseringen i  $\alpha$ -kitin og  $\beta$ -kitin representert med piler (Kadokawa 2013).

## 1.2.2 Anvendelser av kitin

Kitin og derivater av kitin har potensielt stor økonomisk verdi på grunn og mange anvendelser innen mat, kosmetikk, legemidler, vannrensing og landbruk (Gortari & Hours 2013). Kitin kan aktivere makrofager og kan hemme vekst av tumorceller i mus. Kitin har også antibakterielle egenskaper og lav toksisitet ovenfor pattedyr. Fiber og film av kitin har medisinske anvendelser som sårbandasje og kontrollert administrering av legemidler. Det hevdes at kitiooligomerer har krefthemmende egenskaper (Rinaudo 2006). Kompositte materialer som inneholder kitin er benyttet i kunstig fremstilling av beinvev. Et kompositte materiale bestående av hydroxyapatit, kitin og kitosan er benyttet i tenner (Venkatesan et al. 2014). Kitin og kitosan derivater adsorberer en rekke forurensende stoffer i vann og har stort potensiale innen vannrensing (Bhatnagar & Sillanpää 2009). Kitin er biologisk reproducerbart, biodegraderbart og forurenser ikke miljøet (Tharanathan & Kittur 2003).

## 1.3 Hydrokarboner

Hydrokarboner består kun av atomene karbon og hydrogen. Alkaner inneholder ingen umettetheter i form av dobbel- eller trippelbindinger, alkener inneholder en eller flere dobbelt bindinger, mens alkyner inneholder en eller flere trippelbindinger. Hydrokarboner kan være organisert i rette kjeder eller ulike forgreininger. Hydrokarboner kan også være sykliske. Petroleum og naturgass er de to viktigste kildene til hydrokarboner. Petroleum er en blanding av en mengde forskjellige hydrokarboner og inneholder alkaner, sykloalkaner og aromatiske hydrokarboner. Naturgass består hovedsaklig av metan (80%) og etan (5%-10%), men også en andel andre alkaner med lav molekylvekt som propan og butan (Hart 2012).

### 1.3.1 Metanol: produksjon og anvendelser

Konvensjonell produksjon av metanol fra naturgass begynner med en reaksjon med vanndamp ved 1000 °C og danner syntesegass som er en blanding av CO og H<sub>2</sub> ( $\text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO} + 3\text{H}_2$ ). Metanol syntetiseres fra en 2:1 molart forhold mellom H<sub>2</sub> og CO i nærvær av en katalysator bestående av Cu og ZnO ( $2\text{H}_2 + \text{CO} \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$ ). Eksisterende katalysatorer muliggjør bare delvis omdannelse av metan til metanol. Prosessen er energikrevende og trenger relativt høye temperaturer. En katalysator som er aktiv ved lave temperaturer og gir høyt utbytte er meget ønskelig. Metanol kan også produseres fra karbondioksid og hydrogen gass med en passende katalysator ( $\text{CO}_2 + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ ). Metanol kan benyttes som drivstoff i seg selv, men det finnes også kjemiske reaksjoner som konverterer metanol til bensin. Syntesegass kan også omdannes til bensin. I dag er dannelse av bensin fra metanol og syntesegass eller produksjon av metanol til direkte bruk som drivstoff, ikke effektiv nok til å konkurrere økonomisk med bensin produsert fra petroleum (Baird & Cann 2008). I tillegg til drivstoff, konsumeres store mengder metanol i produksjonen av andre kjemikalier hvor metanol benyttes som råstoff. Metanol kan også benyttes som karbonkilde i vekst av mikroorganismer som inngår i biologisk fjerning av nitrogen fra avløpsvann (Cheng & Kung 1994).

## 1.4 utfordringer med foredling av metan og kitin

I den biologiske funksjonen til kitin som et strukturelt polysakkarid er styrke og motstandsevne svært viktig. Kitin danner ett nettverk av hydrogenbindinger, innad i en kitin polymer og mellom polymerene, og danner en krystallinsk struktur som er svært vanskelig og depolymerisere.



Kontrollert oksidasjon av alkaner, særlig metan av kommersiell interesse, er en stor vitenskapelig utfordring. Alkaner inneholder kun kovalente enkeltbindinger som er upolare og er inerte molekyler, men alkaner reagerer med molekylært oksygen i en sterk eksoterm reaksjon med CO<sub>2</sub> og H<sub>2</sub>O som produkter. Reaksjonen trenger nok energi til å overkomme aktiveringsenergien, gjerne i form av en flamme eller gnist, etter det er resterende reaksjoner spontane, eksoterme og termodynamisk favoriserbare (Hart 2012). Dissosiasjonsenergien til C-H binding i metan er høyest av alle alkanene. Når C-H bindingen brytes dannes et dipolmoment i molekylet, noe som fører til et mer reaktivt molekyl og de resterende C-H bindingene svekkes (Baird & Cann 2008).

## 1.5 Lytisk polysakkarid monooksygenase

På grunn av styrken og motstandsevnen til kitin og cellulose har naturen utviklet enzymer kalt lytisk polysakkarid monooksygenase (LPMO). LPMOer er redokszymer som bryter glykosidbindinger i polysakkarider med en oksidativ mekanisme. De nye endene som dannes gir mer tilgjengelig substrat som klassiske glykosylhydrolaser (GH) kan hydrolysere, noe som effektiviserer og øker depolymeriseringen av vanskelig nedbrytbare polysakkarider. LPMO er ikke bare aktive på krystalliske substrater som cellulose og kitin. Aktivitet på xylan, xyloglykan, glukomannan, lichenan og stivelse er rapportert. LPMOer er viktige enzymer i degradering av biomasse som kan omdannes til biodrivstoff og etablere en bærekraftig bioøkonomi i fremtiden (Hemsworth et al. 2015).

### 1.5.1 Historie og klassifisering

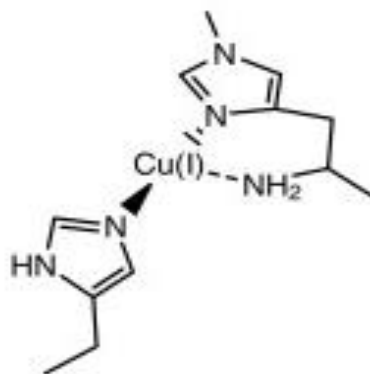
LPMO ble først klassifisert i glykosylhydrolase familie 61 (GH61) bestående hovedsakelig av fungale enzymer og karbohydratbindende modul familie 33 (CBM33) for det meste bakterielle proteiner (Hemsworth et al. 2015). I 2010 ble det vist at GH61 ikke hadde hydrolytisk aktivitet, men førte til mindre mengde av andre GHer nødvendig for depolymerisering i nærvær av en rekke divalente metallioner (Harris et al. 2010). Samme år ble det også vist at et protein i CBM33 familien (CBP21) dekrystalliserer kitin med en oksidativ mekanisme som er avhengig av molekylært oksygen og en reduktant. Det ble også foreslått at GH61 kan ha samme oksidative mekanisme (Vaaje-Kolstad et al. 2010). GH61 ble påvist å være oksidative enzymer med kobber som kofaktor (Quinlan et al. 2011). Kobber har også vist seg å være kofaktoren i CBM33 enzymer (Vaaje-Kolstad et al. 2012). LPMOer kan oksidere karbon 1 (C-1) eller karbon 4 (C-4) på sukkerringen. C-1 oksidasjon fører til aldonsyre på reduserende ende, mens C-4 oksidasjon gir en ketoaldose på den ikke-

reduserende enden. Nå klassifiseres LPMOer i CAZy, en database med karbohydrat aktive enzymer, under auxiliary activity (AA) familier og GH61 har blitt omdøpt til AA9 mens CBM33 har blitt omdøpt til AA10 (Hemsworth et al. 2015). AA inneholder redoksensymer som jobber i synergi med karbohydrat aktive enzymer. To nye familier, AA11 og AA13, har også blitt dannet. Familiene AA9, AA11 og AA13 består hovedsakelig av fungale enzymer, mens AA10 inneholder for det meste bakterielle enzymer (Borisova et al. 2015). Noen LPMOer kan også oksidere  $\alpha$ -glykosidbinding i stivelse, noe som viser diversiteten i substrater LPMOer kan oksidere (Lo Leggio et al. 2015).

### 1.5.2 Struktur og aktivt sete

LPMO har en felles tertiær struktur med en  $\beta$ -sandwich struktur som kan minne om immunoglobuliner. Strukturen inneholder også områder bestående av små  $\alpha$ -helikser og loops som er svært varierende mellom ulike LPMOer. Det aktive setet befinner seg på en flat overflate som er kompatibel for interaksjon med rette krystallinske substrater som cellulose og kitin (Hemsworth et al. 2013).

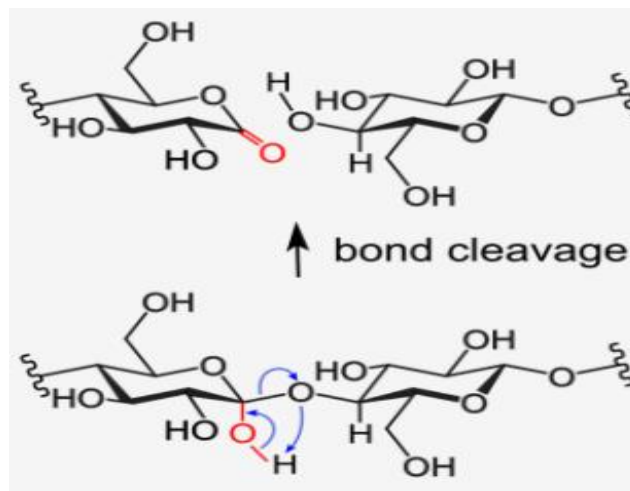
Det aktive setet i LPMOer består av ett kobberatom som koordineres av tre nitrogen ligander. To av ligandene kommer fra den terminale histidin residuens amingruppe og imidazolring. Den siste liganden kommer fra imidazolringen til en histidin residu lengre ute i aminosyresekvensen. Disse tre nitrogen ligandene koordiner kobber med en T-formet geometri og kalles histidine brace. LPMOer benytter bare ett kobberatom som er uvanlig i forhold til andre kobber monooksygenaser som typisk bruker to eller tre kobberatomer for å aktivere oksygen (Hemsworth et al. 2015). Histidine brace er sterkt konservert i alle LPMOer (Walton & Davies 2016).



Figur 1.2: Histidine brace aktivt sete med katalytisk aktiv redusert kobber koordinert av tre nitrogen ligander (Walton & Davies 2016).

### 1.5.3 Reaksjonsmekanisme

Aktivert oksygen og en reduserende agent inngår i monooksygenase reaksjonen katalysert av LPMOer. Produkter etter LPMO reaksjonen er et lakton eller keton avhengig av C-1 eller C-4 oksidering, respektivt. Laktonet kan hydrolyseres til aldonsyre og ketonet kan hydreres til geminal diol. Basert på observerte produkter er det sannsynlig med et hydroksylert intermediat hvor substratets C-H bindingen oksideres til C-OH. Hydroksyleringen etterfølges av en omleiringsreaksjon som fører til brytning av glykosidbindingen i polysakkaridet.



Figur 1.3: Foreslått hydroksylert intermediat (nederst) og observert laktonprodukt (øverst) i kløyving av glykosidbinding via en oksidativ mekanisme katalysert av LPMOer (Bissaro et al. 2016).

Det er hovedsakelig foreslått fire katalytiske sykluser. To basert på kobberbundet superoksid ( $\text{Cu(II)-O}_2$ ) og to basert på kobber-oksyl ( $\text{Cu(II)-O}$ ). I den første superoksid baserte mekanismen binder molekylært oksygen til redusert kobber i LPMO og danner  $\text{Cu(II)-superoksid}$  kompleks og det hevdes at superoksid generert av LPMO er den aktive polysakkarid oksidanten. Den andre superoksid baserte mekanismen tar utgangspunkt i bundet  $\text{Cu(II)-superoksid}$ . Det skjer en hydrogenatom abstraksjon fra substratet med superoksidet, og det dannes  $\text{Cu(I)}$  og peroksyliert substrat ( $\text{ROOH}$ ) som reduseres til  $\text{R-OH}$  eller  $\text{R=O}$ . To kobber-oksyl baserte mekanismer er også foreslått. I den første skjer hydrogenatom abstraksjonen med  $\text{Cu(II)-superoksid}$  og danner  $\text{Cu(II)-O}_2\text{H}$  (hydroperoksyliert) og radikal på substratet som produkt. Enkeltbindingen mellom oksygenatomene kløyves og utfallet blir hydroksylering av substratet ( $\text{R-OH}$ ) og kobber-oksyl dannes i det aktive setet på LPMOen. Elektroner fra en reduserende agent og protoner fører LPMO tilbake til  $\text{Cu(I)}$  ved eliminering

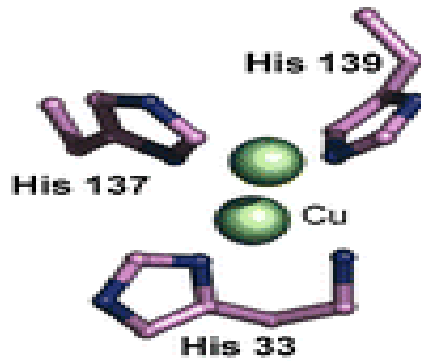
av  $\text{H}_2\text{O}$  fra kobber-oksyl. Det finnes også en mulighet hvor kobber-oksyl utfører hydrogenatom abstraksjonen på substratet. I denne mekanismen blir kobber-superoksid redusert med to elektroner og to protoner og O-O bindingen i bundet superoksid kløyves,  $\text{H}_2\text{O}$  elimineres og kobber-oksyl dannes. Kobber-oksyl utfører hydrogenatom abstraksjonen fra substratet som etterfølges av overføring av hydroksylgruppen fra LPMO-Cu(II)-OH til substratet og LPMO returnerer til LPMO-Cu(I) som kan inngå i en ny katalytisk syklus (Walton & Davies 2016). LPMOer har vist høy aktivitet og stabil kinetikk under anaerobe reaksjonsbetingelser med  $\text{H}_2\text{O}_2$  i reaksjonsblandingen. Høyere affinitet for  $\text{H}_2\text{O}_2$  enn  $\text{O}_2$  er også påvist.  $\text{H}_2\text{O}_2$  er muligens kosubstratet for LPMOer (Bissaro et al. 2016).

#### **1.5.4 Elektronoverføring**

LPMO aktivitet er avhengig av en elektronkilde (Kracher et al. 2016). Reduksjonen av LPMOer kan skje med mange ulike reduserende agenter som for eksempel askorbinsyre, gallussyre og redusert glutation. Cellobiosedehydrogenase (CDH) er et enzym som oksiderer cellobiose til cellobiono-1,5-lactone. Det er indikasjoner på at CDH kan fungere som elektrondonor til LPMO (Horn et al. 2012). Lignin er en stor bestanddel av lignocellulose og kan benyttes som en elektronkilde for LPMOer. Resveratrol, katekin, koffeinsyre, sinapinsyre og hydrokinon fungerer også som elektrondonorer for LPMOer (Westereng et al. 2015).

### **1.6 LPMO katalysert hydrokarbonoksidasjon**

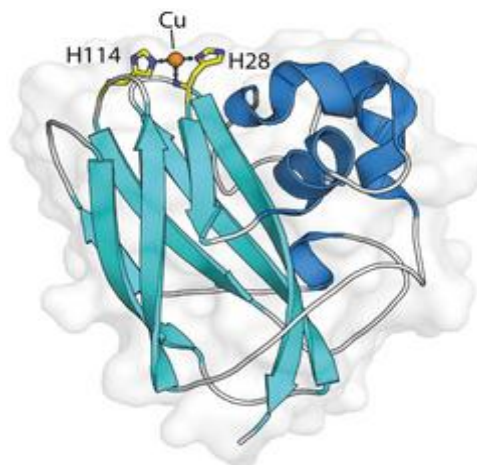
Metan monooksygenase (MMO) er enzymer som katalyserer oksidasjonen av metan til metanol. Denne reaksjonen er det første steget i metabolismen av metan hvor metanotrofe bakterier utnytter metan som energikilde. Det finnes to former av MMO: en løselig form, sMMO, og en partikulær membranbundet form, pMMO (Hakemian & Rosenzweig 2007). sMMO katalyserer hydroksylering av metan med et aktivt sete bestående av to jern atomer, mens pMMO aktivitet er avhengig av kobber og det aktive setet er forslått som et dinukleært kobbersenter koordinert av tre histidin ligander (Balasubramanian et al. 2010). Som tidligere nevnt består det aktive sete til LPMOer av et kobberatom koordinert av den terminale aminogruppen og imidazolringen på samme aminosyre og en histidine sidekjede lengre ute i sekvensen, kalt histidine brace. pMMO og LPMO har relativt lik aktiv sete geometri og høye sammenlignbare verdier innen oksidativ styrke. pMMO oksiderer metan som har en C-H bindingsstryke på 104 kcal/mol, mens LPMOer kan oksidere bindinger mellom karbon og hydrogen med en bindingsstyrke på minst 95 kcal/mol (Frandsen et al. 2016).



Figur 1.4: *pMMO* aktivt sete i *Methylococcus capsulatus* (Hakemian & Rosenzweig 2007).

### 1.6.1 CBP21

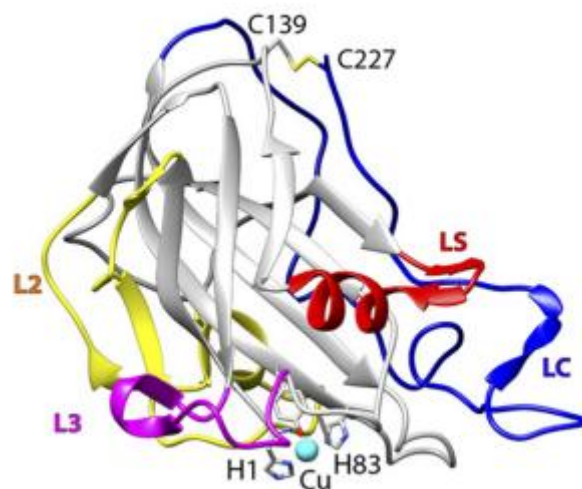
CBP21 har sin naturlige rolle som en del av det kitinolytiske maskineriet til den gram negative bakterien *Serratia marcescens*, og er følgelig en kitinaktiv C-1 oksiderende LPMO. Systematisk navn for CBP21 er SmLPMO10A. Krystallstrukturen til CBP21 er en  $\beta$ -sandwich stabilisert med to disulfid broer. Aromatiske aminosyrer som kunne tenkes å binde til polysakkaridet er lokalisert på innsiden av proteinet og har vanskeligheter med å interagere med kitin. Bindingsoverflaten består hovedsakelig av hydrofile aminosyrer (Vaaje-Kolstad et al. 2005b). CBP21 var den første LPMOen som ble oppdaget og dens oksidative karakter beskrevet (Vaaje-Kolstad et al. 2010). CBP21 sin rolle i kitinnedbrytning ble først identifisert som en ikke katalytisk mekanisme, men bidro til kitinnedbrytning ved å gjøre strukturelle endringer i krystallinsk kitin og øke substrat tilgjengeligheten for klassiske GHer i det kitinolytiske maskineriet til *Serratia marcescens* (Vaaje-Kolstad et al. 2005a).



Figur 1.5: Strukturen til CBP21 fra *Serratia marcescens*.  $\beta$ -sandwich strukturen er vist i lyseblå, koordinerende histidiner i gul og kobber i oransje (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

## 1.6.2 NcLPMO9C

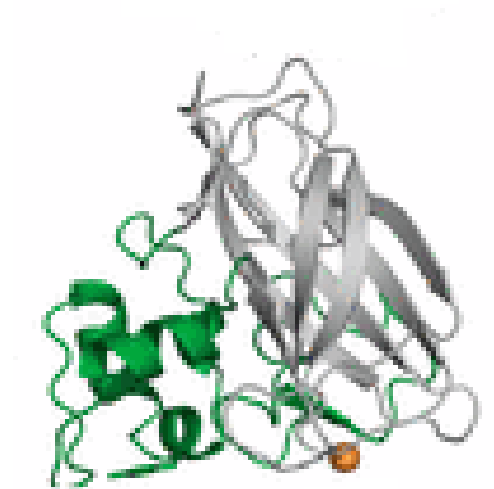
NcLPMO9C fra fungusen *Neurospora crassa* er en LPMO med aktivitet mot krystallinsk cellulose, men også andre  $\beta$ -glukaner som korte  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glukose kjeder i form av cellodextrin og xyloglukan som er en type hemicellulose. Det katalytiske domenet inneholder en polar substratbindende overflate som kan interagere med ulike sukker substrater. Domenet består av en  $\beta$ -sandwich struktur med 8  $\beta$ -tråder, den inneholder også to disulfid broer. NcLPMO9C er C-4 oksiderende og har aktivitet mot løselige cellodextriner og hemicelluloser med  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glukose ryggrad som xyloglukan og glucomannan. NcLPMO9C består av to domener, et N-terminalt katalytisk domene og et karbohydrat bindende domene (CBM1). CBM1 kan både binde krystallinsk og amorf cellulose. Domenene er koblet sammen med en linker på ca 50 aminosyrer bestående hovedsakelig av serin og treonin (Borisova et al. 2015). Merkelig er NcLPMO9C aktiv på løselige cello-oligosakkarider og aktivitet på tetramer er påvist. Dette er i kontrast med tidligere karakteriserte LPMOer som kun er aktive på polysakkarider (Isaksen et al. 2014).



Figur 1.6: Strukturen til det N-terminale katalytiske domenet i NcLPMO9C fra *Neurospora crassa*. Kobber er vist i lyseblå og  $\beta$ -sandwich strukturen i hvit (Borisova et al. 2015).

### 1.6.3 CelS2

CelS2 kommer fra den gram positive bakterien *Streptomyces coelicolor* som har sitt habitat i jordsmonn. CelS2 har systematisk navn ScLPMO10C og oksiderer C-1 i cellulose. Som andre LPMO består CelS2 av  $\beta$ -sandwich struktur som er rik på aromatiske aminosyrer som kan være viktige i elektrontransport til det aktive setet og reduksjon av kobberet. Aromatiske aminosyrer er ofte viktige i enzym-karbohydrat interaksjoner med aromatiske ringer parallelt med bindingsoverflaten. CelS2 har bare en aromatisk ring parallell med bindingsoverflaten på enzymet, men denne aminosyren er konservert i alle LPMOer i familie 10 (Forsberg et al. 2014a). CelS2 binder sterkt til kitin, men katalytisk aktivitet er ikke observert. Sammenlignet med binding til kitin er bindingen til det naturlige substratet cellulose svakere (Forsberg et al. 2014b).



Figur 1.7: Strukturen til CelS2 fra *Streptomyces coelicolor*.  $\beta$ -sandwich strukturen er vist i hvit og kobber i oransje (Forsberg et al. 2014a).

## 1.7 Glykosylhydrolase

GH er enzymer som katalyserer hydrolyse av glykosidbindinger. GHer er spesifikke ovenfor  $\alpha$  eller  $\beta$  konfigurasjon av anomere karbonatomer og hydrolyserer ofte en av bindingstypene. Dette er grunnen til at mennesker kan fordøye stivelse og ikke cellulose som begge er polysakkarider av glukose, med henholdsvis  $\alpha$  og  $\beta$  glykosidiske bindinger (Nelson & Cox 2008). GHer er viktige i karbohydratmodifisering og finnes i en rekke ulike organismer. Karbohydrater benyttes til energilagring, har strukturelle egenskaper og viktige roller som signalmolekyler. GHer er viktige i reguleringen og balansen av karbohydrater i mange biologiske prosesser (Davies & Henrissat 1995).

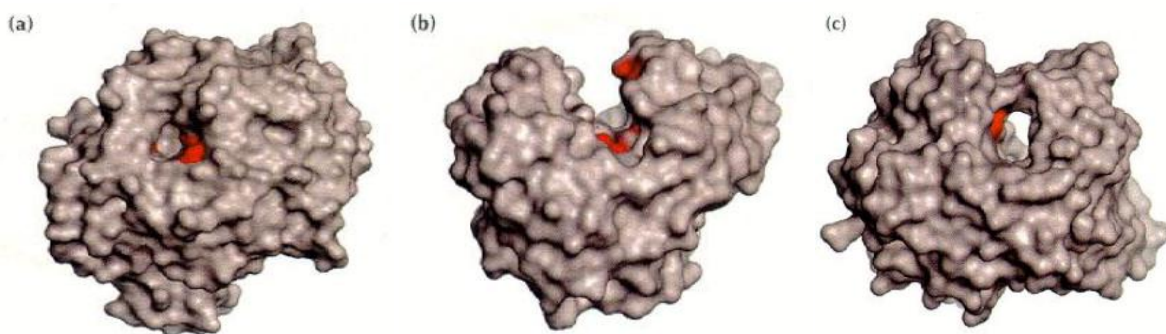
## 1.7.1 Struktur og virkningsmekanisme

Det finnes stor diversitet innen GHer og virkningsmekanismer. Enzymet kan være endoaktiv og kløyve internt i polysakkaridkjeden, eller være eksoaktiv kløyve fra endene. Både endoaktive og eksoaktive enzymer kan være prosessive eller ikke-prosessive. Aktiviteten og virkemåte til ulike GHer er i stor grad bestemt av enzymtopologien rundt det aktive sete. Tre topologier har blitt bestemt for GHer: lomme/krater, kløft og tunnel.

Topologien lomme eller krater er benyttet av enzymer som kløyver på enden av oligosakkarider og polysakkarider samt enzymer som kløyver disakkarider. Enzymer som katalyserer reaksjonen på enden av polysakkarider er nyttige for substrater som har mange tilgjengelige ender, men er ineffektiv på fibrøse substrater med få tilgjengelige ender som for eksempel krystallinsk cellulose og kitin.

Den halvåpne topologien kløft muliggjør binding til flere suktermolekyler i midten av polymere substrater og er vanlig å finne i enzymer som er endoaktive.

Tunnel topologien danner en tunnel som substratet kan tres gjennom. Denne topologien muliggjør katalyse og frigjøring av produkt samtidig som enzymer holdes bundet til polysakkaridet. Topologien er viktig for prosessivitet og finnes følgelig i prosessive enzymer. En egenskap som er viktig i enzymatisk nedbrytning av uløselige krystallinske polysakkarider (Davies & Henrissat 1995).



Figur 1.8: Tre ulike topologier ved det aktive sete til glykosylhydrolaser. A) lomme/krater (glukoamylase fra *A. awamori*) b) kløft (endoglukananase E2 fra *T. fusca*) c) tunnel (cellobiohydrolase II fra *T. reesei*). Katalytiske aminosyrer farget i rødt. (Davies & Henrissat 1995).

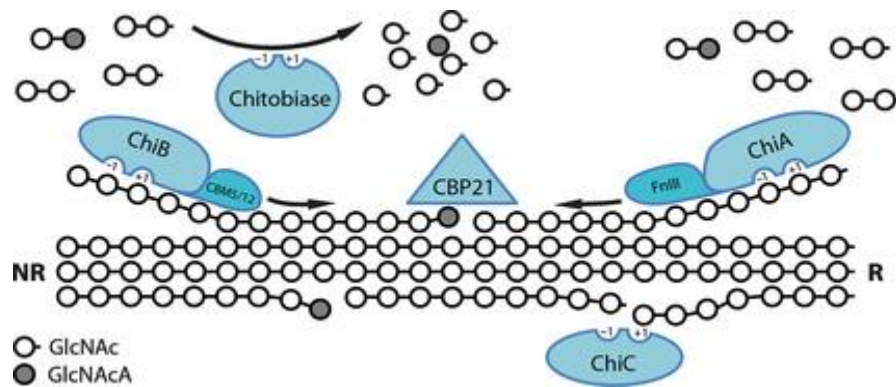


## 1.7.2 Kitinaser

GHer er svært vanlige i naturen og finnes i en mengde ulike varianter. En type GH er kitinaser. Kitinaser katalyserer hydrolysen av glykosidbindinger i polysakkaridet kitin og finnes i en rekke ulike organismer som bakterier, sopp, planter, leddyr og mennesker. Kitinaser er en gruppe enzymer med stor diversitet med hensyn på molekylær struktur, substratspesifisitet og katalytisk mekanisme (Hamid et al. 2013). I CAZy klassifiseres kitinaser i familie 18 og 19 av GHer (Lombard et al. 2014). Kitinaser har også mange ulike fysiologiske funksjoner. Noen bakterier benytter kitinaser i omsetning av næringsstoffer og i parasittisme, mens sopp og leddyr benytter kitinaser i morfogenese. Kitinaser finnes også i planter og vertebrater og er involvert i forsvarsmekanismer mot patogener som inneholder kitin. Kitinaser kan også brukes i landbruket til kontroll av patogener som inneholder kitin (Patil et al. 2000).

## 1.8 Kitinolytisk maskineri til *Serratia marcescens*

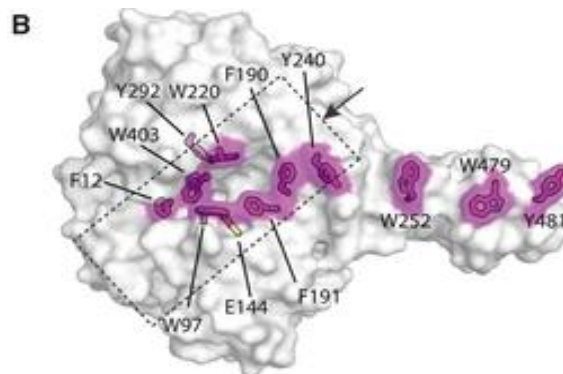
Kitin depolymeriseringen til den gram negative bakterien *Serratia marcescens* er et system som er svært godt studert. Det kitinolytiske maskineriet består av enzymene kitinase A (ChiA), kitinase B (ChiB), kitinase C (ChiC), CBP21 og kitobiase. ChiA og ChiB er eksoaktive, prosessive kitinaser med motsatt direksjonalitet. ChiA er aktiv fra reduserende ende, mens ChiB er aktiv fra ikke-reduserende ende. ChiC er en ikke-prosessiv kitinase og endoaktiv. CBP21 er en LPMO som bryter glykosidbindinger i kitin med en oksidativ mekanisme, noe som fører til mindre krystallinsk kitin og nye ender som kitinaser benytter som substrat i hydrolyse av polymeren. Kitobiase omdanner produkter fra kitinaser (dimerer) til *N*-acetylglukosamin. (Vaaje-Kolstad et al. 2013). Det er også vist at kitobiase kan hydrolysere kitooligosakkarider fra den ikke-reduserende enden og danne *N*-acetylglukosamin. Oksidert kitooligosakkarider hydrolyseres av kitobiase og danner *N*-acetylglukosamin og oksidert *N,N*-diacetylkitobiose (DP2ox) som produkter (Loose et al. 2014).



Figur 1.9: Kitinolytisk maskineri til *Serratia marcescens* (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

### 1.8.1 Kitinase B (ChiB)

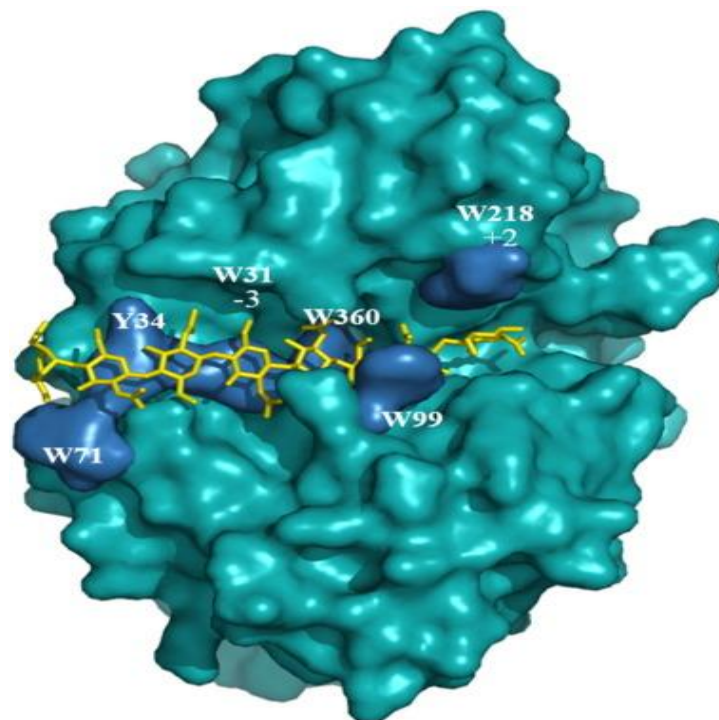
ChiB har et katalytisk domene med en  $(\beta/\alpha)_8$  TIM barrel struktur og kitin bindende modul (CBM5) lokalisert C-terminalt. Den kitin bindende strukturen består av konserverte tryptofan residuer som interagerer med substratet. Domenet øker substrataffinitet og effektivitet i hydrolyse av kitin, særlig krystallinske former. Området rundt det aktive setet består hovedsakelig av aromatiske aminosyrer som inngår i viktige interaksjoner med substratet (Vaaje-Kolstad et al. 2013). Interaksjon mellom  $\pi$ -elektroner i aromatiske aminosyrer og C-H grupper i pyranose ringer er ofte involvert (Asensio et al. 2013).



Figur 1.10: Struktur av kitinase B (ChiB) fra *Serratia marcescens*. Aromatiske aminosyrer som interagerer med substratet er farget lilla og den katalytiske syren, E144, farget gul. (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

## 1.9 Humane kitinaser

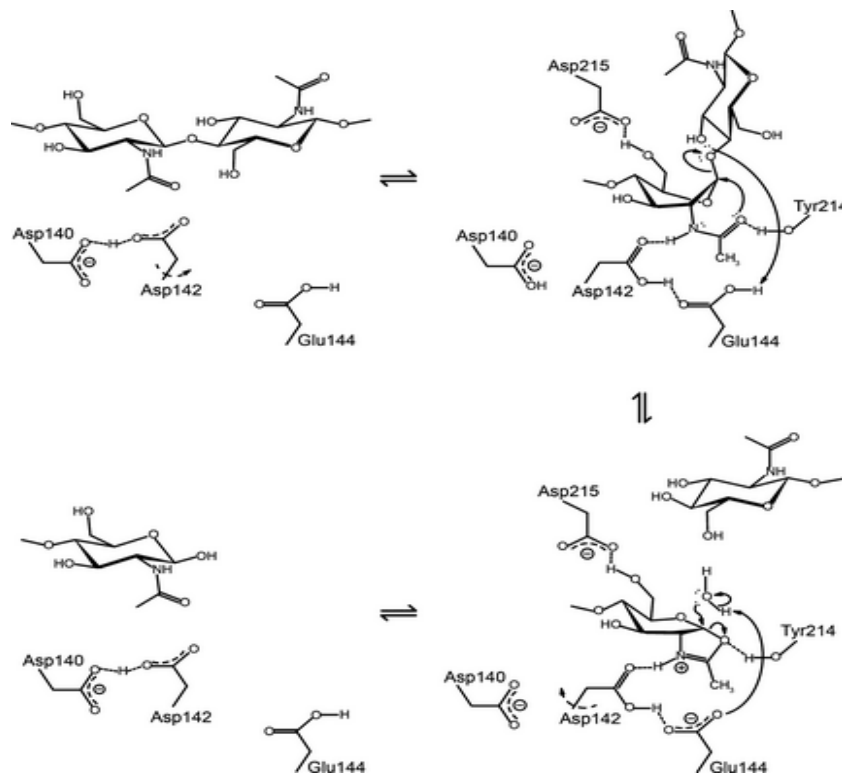
Åtte kitinaser har blitt identifisert hos mennesker. Bare to av disse, human chitotriosidase (HCHT) og acidic mammalian chitinase (AMCase), har kitinolytisk aktivitet. Resterende kitinaser har en mutert glutamat residu som er essensiell for katalyse (Guan et al. 2009). HCHT er klassifisert i GH familie 18 og blir syntetisert og sekretert av makrofager. Mennesker produserer ikke kitin eller bruker kitin som næringsstoff og kitinaser kan ha en funksjon innen immunresponsen mot patogener som inneholder kitin. Det katalytiske domenet består av en  $(\beta/\alpha)_8$  TIM barrel og inneholder mange aromatiske aminosyrer rundt det aktive setet, samt en familie 14 karbohydrat bindende domene. HCHT består av to isoformer med molekylvekt på henholdsvis 50kDa og 39kDa. Isoformen med molekylvekt på 39 kDa mangler CBM. HCHT har en relativt grunn topologi ved det aktive sete, men viser høy grad av depolymerisering av krystallisk kitin (Eide et al. 2016). De to domene i HCHT-50 er koblet sammen med en fleksibel linker rik på prolin. En konsekvens av dette er at det katalytiske domenet sin posisjon varierer mer i forhold til CBM i kontrast til kitinaser fra *Serratia marcescens*. Virkningsmekanismen til HCHT er endo-prosessiv (Kuusk et al. 2017).



Figur 1.11: Struktur av isoformen HCHT 39kDa i kompleks med en oktamer av kitin. Aromatiske aminosyrer er farget blå. W31 er markert i subsete -3 og W218 er markert i subsete +2 (Eide et al. 2016).

## 1.10 Substrat assistert mekanisme

Familie 18 GH, som inneholder human chitotriosidase (HCHT) og kitinase B (ChiB), hydrolyserer kitin med en substrat assistert mekanisme. *N*-acetyl karbonylgruppen utfører et nukleofilt angrep på det anomeriske karbonet på sukkeret i -1 posisjon og danner et oxazolinium ion. For dannelse av oxazolinium intermedietet må sukkeret i -1 endre konformasjon fra stol til båt. Utgående gruppe er sukkeret i +1 som protoneres av den katalytiske glutamat residuen. Det dannede karboksylatet aktiverer et vannmolekyl som hydrolyserer oxazoliniumionet og danner en hydroksylgruppe på sukkeret i -1. I figur 1.12 er substrat assistert mekanisme for kitin hydrolyse eksemplifisert med ChiB. Asp142 og Tyr214 inngår i interaksjon med *N*-acetylgruppen og promoterer nukleofilt angrep på det anomeriske karbonet. I tillegg stabiliserer Asp142 den positive ladningen på oxazoliniumionet og har en rolle i endring av pKa verdien til den katalytiske syren som varierer i løpet av den katalytiske syklusen. Asp140 bidrar med å bestemme posisjonering og protonering av Asp142. Asp215 er viktig i binding av sukkeret i -1 i en forvrengt konformasjon (Synstad et al. 2004; Vaaje-Kolstad et al. 2013).



Figur 1.12: Substrat assistert mekanisme benyttet av GH18 i hydrolyse av kitin. Eksemplifisert med kitinasen ChiB fra *Serratia marcescens* (Vaaje-Kolstad et al. 2013).

## 1.11 Aromatiske residuer og prosessivitet

Prosessivitet er evnen til å katalysere flere reaksjoner uten å dissosiere fra substratet. Konseptet prosessivitet fører til at katalytisk effektivitet økes ved å holde enzymet i nærheten av substratet mellom katalytiske sykluser. Prosessivitet er en viktig egenskap i depolymerisering av krystallinske substrater da det hinder reassosiasjon av polysakkaridkjeder som er separert fra krystallstrukturen. Å separere en polysakkaridkjede fra krystallstrukturen er en stor energibarriere i depolymerisering av krystallinske polysakkarider. Prosessive kitinaser, som ChiB og HCHT, inneholder mange aromatiske aminosyrer som er viktige for prosessiviteten. Aromatiske aminosyrer binder til polysakkaridet og bidrar med føringen av polymeren gjennom det aktive setet. Mutasjoner av aromatiske aminosyrer nærliggende det aktive setet reduserer aktiviteten mot krystallinsk substrat, mens mutasjoner har ingen effekt og i noen tilfeller øker aktiviteten mot løselige amorfe substrater. Prosessivitet er fordelaktig i depolymerisering av uløselig krystallinske substrater, men kan være en ulempe i depolymerisering av tilgjengelige, løselig og amorfe substrater (Horn et al. 2006).

## 1.12 Enzym kinetikk: Kostylev og Wilsons modell

Michaelis-Menten kinetikk er basert på antagelser som konstant enzym-substrat kompleks (steady state) og homogent substrat. Disse antagelsene er ofte ikke oppfylt i hydrolyse av krystallinske substrater. Kostylev og Wilson har utredet en kinetikk modell for depolymerisering av krystallinske substrater. Modellen er gitt i likning 1 og inneholder også et tidspareparameter i motsetning til Michealis-Menten ligningen.

Likning 1:  $X=At^b$

$X$  er prosent nedbrutt  $\beta$ -kitin basert på mengde monomer og dimer detektert,  $A$  er et mål på total enzymaktivitet,  $b$  kalles hydrolysefaktoren som er et mål på enzymets evne til å overkomme hindringer i det krystallinske substratet og  $t$  er tid (Kostylev & Wilson 2013).

### 1.13 Glukoseoksidase

Enzymet glukoseoksidase (GOX) fra fungusen *Aspergillus niger* består av to identiske 80 kDa subenheter og to flavin adenin dinukleotid koenzymer. GOX benytter molekylært oksygen i oksidasjonen av glukose og danner  $H_2O_2$  og glukono- $\delta$ -laktone som produkter. GOX finnes naturlig i mange sopp og insekter hvor det katalytiske produktet,  $H_2O_2$ , virker anti-bakterielt og anti-fungalt (Wong et al. 2008). I fravær av substrat produserer LPMOer hydrogenperoksid (Kittl et al. 2012). Konklusjonen at LPMOer benytter  $O_2$  som kosubstrat er hovedsakelig basert på at katalysereaksjonen forbruker molekylært oksygen og reduktant.  $H_2O_2$  kan føre til oksidativ skade på enzymer og inaktivering. Denne oksidative skaden er hovedsakelig detektert på aminosyrer rundt det aktive setet og tyder på affinitet for hydrogenperoksid. (Bissaro et al. 2016).

### 1.14 Mål med oppgaven

Denne oppgaven er tredelt. Kitinasene ChiB og HCHT har mange aromatiske aminosyrer i nærheten av det aktive setet som er viktig for prosessivitet, hastighet og effektivitet i depolymerisering av krystallinsk kitin. I den første delen av oppgaven er målet å studere om forbehandling av kitin med CBP21 gjør at ChiB og HCHT varianter med tryptofan til alanin muteringer kan katalysere hydrolyse av kitin raskere enn villtype under like betingelser. CBP21 vil gjøre substratet mindre krystallinsk hvilket foreslår at prosessivitet vil være en unødvendig egenskap i depolymeriseringen.

I den andre delen av oppgaven var målet å benytte LPMOer til selektiv oksidasjon av hydrokarboner med hydroksylerte derivater som ønsket produkt. Det aktive setet til LPMO er sammenlignbart med pMMO som har metan som naturlig substrat. En direkte katalytisk rute fra metan til metanol er ettertraktet og av kommersiell interesse.

I den siste delen av oppgaven var rettet mot in situ generering av  $H_2O_2$  som kosubstrat for LPMOer. Høye konsentrasjoner av  $H_2O_2$  kan oksidere enzymet og føre til inaktivering. Enzymet glukoseoksidase danner  $H_2O_2$  fra glukose og dette systemet er tenkt å produsere kosubstratet til LPMOen med en hastighet som medfører konsentrasjoner av  $H_2O_2$  minsker grad av enzyminaktivering. Ved optimalisering av in situ generering av hydrogenperoksid kan dette føre til økt enzym aktivitet under mildere reaksjonsbetingelser.

## 2 Materialer

### 2.1 Laboratorieutstyr

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Leverandør
Autoklavteip	13 mm	VWR
Automatpipetter	Finnpipetter	Thermo Scientific
Avtrekkskap	Mc6	Waldner
Blåkorkflasker	1000 ml 500 ml 250 ml 100 ml 50 ml	VWR
Blåkorkrør, cellstar®	50 ml 15 ml	Greiner Bio One
Bordsentrifuge	Sigma 1-14	LABEX
Cryorør	2 ml	Sarstedt
Dyrkningskolber	2 L	Nalgene
Elektroforeseutstyr	Gelkammer Spenningskilde	Life Technologies
Eppendorfrør	1.5 ml	Axygen
Filter	Duapore Membrane 0.45 µm Ultrafree ® MC 0.22 µm	Millipore Millipore
Fryser	-20 °C -80 °C	Bosch SANYO
Gasskromatografi (GC)	6890 Gasskromatograf 7679A Headspace Autosampler Flammeionisasjonsdetektor	Agilent Technologies
GC-kolonne	CP-SIL 5CB GC 25 m x 0.53 mm x 5.0 µm.	Varian
Gelfoto	Gel Doc EZ Imager	Bio-Rad

<b>Glassutstyr</b>		Schott-Duran/VWR
<b>Headspacerør</b>		Agilent Technologies
<b>HiLoad 16/600 Superdex 75 pg</b>	120 ml	GE Healthcare
<b>HiTrap DEAE FF</b>	5 ml	GE Healthcare
<b>HiTrap Phenyl HP</b>	5 ml	GE Healthcare
<b>HiTrap SP HP</b>	5 ml	GE Healthcare
<b>High performance liquid chromatography (HPLC)</b>	Dionex Ultimate 3000 Autoinjektor UV/VIS detektor Agilent 1290 Infinity Autoinjektor UV/VIS detektor	Thermo Scientific  Agilent Technologies
<b>HPLC-forkolonner</b>	Carbo-H 4 x 3.0 mm BEH amide 1.7 µm	Phenomenex Waters
<b>HPLC-kolonner</b>	Rezex RFO-Fast Fruit H+ 7.8 x 100 mm Acquity UPLC BEH amide 1.7 µm, 2.1 x 50 mm	Phenomenex Waters
<b>HPLC vials</b>	Microvials PP 11mm Snap Ring Cap	VWR
<b>Inkubator</b>		Termaks
<b>Isbitmaskin</b>	KF 145	PORKKA
<b>Kanyler</b>	0.8 mm x 40 mm	BD Microlanc™ 3
<b>Kjøleskap</b>		Gram
<b>Kyvetter</b>	1 x 1 cm UV-etter	VWR Eppendorf
<b>LP-kromatografisystem</b>	BioLogic LP system BioFrac Fraction Collector Kolonne Stempel	Bio-Rad
<b>Magnetrorer</b>		VWR



<b>Mikrobølgeovn</b>	L17MSB13E	Logik
<b>Mikrovekt</b>	Sartorius CP-2P	VWR
<b>Oppkonsentreringsrør</b>	Amicon® Ultra-15 10K Macrosep® Advance 30K	Merck Millipore Pall Corporation
<b>Parafilm</b>	5 cm	VWR
<b>PD MiniTrap™ G-25</b>		GE Healthcare
<b>PD MidiTrap™ G-25</b>		GE Healthcare
<b>Petriskåler</b>	9 cm	Heger
<b>pH-meter</b>	FiveEasy Plus	Mettler Toledo
<b>Pipettespisser</b>	”Next generation Tip refill”	VWR
<b>Ristebrett</b>	PS-3D Sunflower mini- shaker	Grant Bio
<b>Risteinkubator</b>	Multitron Standard	Infors
<b>Schlenk line</b>		Assistent
<b>Sentrifuge</b>	Avanti™ J-25 Sentrifuge-5430R	Beckman Coulter Eppendorf
<b>Sentrifugerotor</b>	JA-10 JA-25.50 5430/5340 R	Beckman Coulter Beckman Coulter Eppendorf
<b>Sentrifugerør</b>	500 ml 50 ml	Nalgene
<b>Sonikeringsbad</b>	Transonic 460/H	Elma
<b>Spektrofotometer</b>	AG Biophotometer	Eppendorf
<b>Sprøytefilter</b>	0.22 µm	Sarstedt
<b>Sprøyter</b>	1 ml 2 ml 5 ml	BD Plastipak™
<b>Vakuumfilter</b>	0.22 µm	Millipore
<b>Sterilskap</b>	Av-100	TelStar
<b>Termomikser</b>	Comfort	Eppendorf
<b>Vakuumpumpe</b>		GAST

<b>Vannbad</b>	Typ 1004	GFL
<b>Vekt</b>	LC621P	Sartorius Basic
<b>Vortex</b>	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
<b>Qubit ® fluorometer</b>		Life Technologies

## 2.2 Programvare til dataanalyse

<b>Programvare</b>	<b>Bruksområde</b>	<b>Leverandør</b>
<b>Chromelon Chromatography Studio</b>	HPLC	Chromeleon
<b>ExPASy ProtParam</b>	Beregning av ekstinksjonskoeffisienter ( $\epsilon$ )	ExPASy
<b>ImageLab</b>	Gelvisualisering	Bio-Rad
<b>LP Data View</b>	LP-kromatografisystem	Bio-Rad
<b>Open LAB EZChrom</b>	GC	Agilent Technologies
<b>Origin 7.0</b>	Databehandling	MicroCal

## 2.3 Kjemikalier

<b>Kjemikalie</b>	<b>Molekylformel</b>	<b>Leverandør</b>
<b><math>\alpha</math>-D-Glukose</b>	$C_6H_{12}O_6$	Sigma-Aldrich
<b>(+)-Natrium L-Askorbat</b>	$NaC_6H_7O_6$	Sigma-Aldrich
<b>2-(N-morfolin) etansvovelsyre (MES) (20x)</b>	$C_6H_{13}NO_4S$	Life Technologies
<b>3-(N-morfolin) propansvovelsyre (MOPS) (20x)</b>	$C_7H_{15}NO_4S$	Life Technologies
<b>Acetonitril</b>	$CH_3CN$	Honeywell
<b>Agar</b>		Merck
<b>Ammoniumsulfat</b>	$(NH_4)_2SO_4$	Sigma-Aldrich
<b>Ampicillin natrium salt</b>	$NaC_{16}H_{18}N_3O_4S$	Sigma-Aldrich

<b>Gjærekstrakt</b>		VWR
<b>Glyserol</b>	$C_3H_5O_5$	VWR
<b>Trypton</b>		VWR
<b>Bio-Rad Protein Assay Fargereagens</b>		Bio-Rad
<b>Bis-Tris</b>	$C_8H_{19}NO_5$	VWR
<b>Coomassie Brilliant Blue R-250</b>		Bio-Rad
<b>Destillert vann (milli-Q)</b>	$dH_2O$	Millipore
<b>Dinatriumhydrogenfosfat dihydrat</b>	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich
<b>Eddiksyre</b>	$CH_3COOH$	Sigma-Aldrich
<b>Etan</b>	$CH_3CH_3$	AGA
<b>Etanol</b>	$CH_3CH_2OH$	VWR
<b>Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)</b>	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Sigma-Aldrich
<b>Fenylmetansulfonylfluorid (PMSF)</b>	$C_7H_7FO_2S$	Roche
<b>Glyserol</b>	$C_3H_5O_5$	VWR
<b>Helium</b>	He	AGA
<b>Hydrogenperoksid</b>	$H_2O_2$	Sigma-Aldrich
<b>Hydrogenklorid</b>	HCl	Sigma-Aldrich
<b>Isobutan</b>	$C_4H_{10}$	AGA
<b>Kitinkuler</b>		New England Biolabs
<b>Kobbersulfat</b>	$CuSO_4$	Sigma-Aldrich
<b>L-Askorbinsyre</b>	$C_6H_8O_6$	Sigma-Aldrich
<b>Magnesiumklorid</b>	$MgCl_2$	VWR
<b>Metan</b>	$CH_4$	AGA
<b>N,N'-Diacetylkitobiose (A2)</b>	$C_{16}H_{28}N_2O_{11}$	Megazyme
<b>N-Acetylglukosamin (A1)</b>	$C_8H_{15}NO_6$	Megazyme
<b>Natriumacetat</b>	$NaCH_3COO$	Sigma-Aldrich

<b>Natriumdihydrogenfosfat monohydrat</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
<b>Natriumhydroksid</b>	NaOH	VWR
<b>Natriumklorid</b>	NaCl	VWR
<b>NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel 1,0mm x 10 brønner</b>		Life Technologies
<b>NuPAGE® prøvebuffer (4x)</b>		Life Technologies
<b>NuPAGE® reduserende agent (10x)</b>		Life Technologies
<b>Propen</b>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich
<b>Propenoksid</b>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	Sigma-Aldrich
<b>Sukrose</b>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	VWR
<b>Svovelsyre</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
<b>Sykloheksan</b>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	VWR
<b>Sykloheksanol</b>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	Sigma-Aldrich
<b>Sykloheksanon</b>	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O	KEBO lab
<b>Trizma ® base</b>	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich

## 2.4 Proteiner og substrater

<b>Protein/enzym/substrat</b>	<b>Spesifikasjon</b>	<b>Leverandør</b>
<b>β-kitin</b>	180 μm 0.85 mm	France Chitine Mahtani Chitosan Pvt. Ltd.
<b>Bakterielle kitinaser</b>	ChiB WT ChiB W220A ChiB W97A/W220A	Anne-Grethe Strømnes Selvlaget Selvlaget
<b>Benchmark™ protein ladder</b>		Life Technologies
<b>Glukose oksidase</b>	fra <i>Aspergillus niger</i>	Sigma-Aldrich

<b>Human Chitotriosidase</b>	HCHT-50 WT HCHT-39 WT HCHT-50 W31A HCHT-50 W99A HCHT-50 W218A	Produsert ved SINTEF, rensert ved NMBU (Eide et al. 2016; Stockinger et al. 2015)
<b>Kitobiase</b>		Post doktor Bastien Bissaro
<b>LPMO</b>	CBP21 CelS2 NcLPMO9C	Selvlaget Selvlaget Selvrenset, gjærmediet som inneholder enzymet kommer fra post doktor Anikó Várnai (Isaksen et al. 2014)

## 2.5 Bakteriestammer

Bakteriestamme	Spesifikasjon	Leverandør
<i>Escherichia coli</i> One Shot® BL21 Star™ (DE)	Celler til proteinekspresjon	Life Technologies
<i>Escherichia coli</i> One Shot® TOP10	Celler med høy transformasjonseffektivitet	Life Technologies

## 2.6 Medier

Medium	Innhold	Leverandør
<b>LB-agarplater</b>	10 g Trypton 5 g Gjærekstrakt 10 g NaCl 15 g Agar 1L dH <sub>2</sub> O Autoklaveres 100 µg/ml ampicillin	Selvlaget

<b>LB-medium</b>	10 g Trypton 5 g Gjærekstrakt 10 g NaCl 1L dH <sub>2</sub> O Autoklaveres	Selvlaget
<b>SOC medium</b>		Life Technologies

## 2.7 Kit

<b>Kit</b>	<b>Innhold</b>	<b>Leverandør</b>
<b>E.N.Z.A Plasmid Mini Kit I</b>	Oppsamlingsrør Løsning I/RNase Løsning II: NaOH Løsning III: Guanidin-HCl, Eddiksyre HiBind™ kolonne Ekvilibreringsbuffer: NaOH HBC buffer: Guanidin-HCl, isopropanol DNA vaskebuffer Elueringsbuffer	Omega BIO-TEK
<b>Qubit™ dsDNA BR Assay Kit</b>	Qubit™ dsDNA BR buffer Qubit™ dsDNA BR reagent Qubit™ rør	Life Technologies

## 2.8 Buffere

<b>Bruksområde</b>	<b>Buffer</b>
<b>Affinitetskromatografi, CBP21</b>	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Affinitetskromatografi, ChiB</b>	50 mM Tris-HCl pH 8.0
<b>Glukoseoksidase in situ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generering</b>	50 mM Natriumacetat pH 6.10 50 mM Bis-Tris pH 6.10

<b>Hydrofob interaksjonskromatografi, NcLPMO9C</b>	50 mM Natriumacetat pH 5.7, 35 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50 mM Natriumacetat pH 5.7
<b>Hydrokarbonoksidasjon</b>	50 mM Natriumfosfat pH 7.0
<b>Ionebytterkromatografi, CelS2</b>	50 mM Tris-HCl pH 7.5 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl
<b>Ionebytterkromatografi, NcLPMO9C</b>	50 mM Natriumacetat pH 4.0 50 mM Natriumacetat pH 4.0, 1 M NaCl
<b>Kitin depolymerisering</b>	50 mM Natriumacetat pH 6.10
<b>Størrelseseksklusjonskromatografi, CelS2</b>	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 M NaCl

## 2.9 Løsninger

Løsning	Innhold	Mengde
<b>Arbeidsløsning</b>	NuPAGE® prøvebuffer (4x) NuPAGE® reduserende agent (10x) dH <sub>2</sub> O	50 % 20 %
<b>Avfargingsløsning</b>	EtOH Eddiksyre (konsentrert) dH <sub>2</sub> O	10 % 7,5 %
<b>Fargeløsning</b>	Coomassie Brilliant Blue R-250 EtOH Eddiksyre (konsentrert) dH <sub>2</sub> O	0,1 % 40 % 10 %
<b>Spheroplastbuffer</b>	1M Tris-HCl pH 8.0 Sukrose 0.5 M EDTA pH 8.0 PMSF dH <sub>2</sub> O	30 ml 51.3 g 300 µl 1 tablett Totalvolum 300 ml

## 3 Metoder

### 3.1 Molekylærbiologiske metoder

Forsøk med enzymer fra det kitinolytiske maskineriet til *Serratia marcescens* har blitt utført og ulike molekylærbiologiske metoder utført. Frysestocker med BL21 celler med innsatt vektor for samtlige enzymer benyttet eksisterte fra tidligere forsøk. Gamle celler eller gjentatte opptinings- og nedfrysningssykluser kan føre til dårligere proteinuttrykk. Isolering av plasmidet og transformering inn i nye celler kan løse problemet med lavt proteinuttrykk og ble utført for ChiB WT, ChiB W220A og ChiB W97A/W220A. Plasmidet for ChiA F396A og ChiB F190A ble isolert fra BL21 celler, transformert inn i TOP10 celler, isolert fra TOP10 celler for igjen å bli transformert inn i nye BL21 celler. En slik retransformering via TOP10 celler kan øke uttrykk av protein.

#### 3.1.1 Oppdyrking av bakteriestamme

For å kunne isolere plasmid til transformering er det først nødvendig å dyrke opp celler som inneholder det muterte plasmidet. Plasmidet inneholder et resistensgen mot ampicillin, og cellene dyrkes derfor i LB-medium som inneholder ampisillin slik at uønsket vekst av andre bakterier hindres.

Materialer:

- LB-medium
- 100 mg/ml ampicillin
- Frysestock

Metode:

5 ml LB-medium og 2.5 µl 100 mg/ml ampicillin ble tilsatt i et dyrkingsrør. Celler med ønsket plasmid ble deretter inokulert i løsningen. Bakteriekulturen ble inkubert over natt ved 37 °C og 200 rpm.

#### 3.1.2 Isolering av plasmid

Plasmid fra bakteriekulturen ble isolert med E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I. Ved bruk av dette kittet blir cellene først alkalisk lysert. HiBind® kolonnematriks binder spesifikt til DNA og RNA mens proteiner, andre cellekomponenter og forurensinger fjernes. Bindingen til HiBind® kolonnen er reversibel, og bundet DNA kan elueres med deionisert vann eller en buffer med lav saltkonsentrasjon (Omega Bio-Tek 2013).



Materialer:

- Cellekultur
- E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I

Metode:

1.5 ml cellekultur ble overført til et eppendorfrør og spunnet ned ved 10 000 x g i 1 minutt. Mediet ble fjernet, og cellepelleten ble resuspendert i 250 µl løsning I tilsatt RNase. 250 µl løsning II ble tilsatt før røret ble snudd forsiktig til et klart lysat ble dannet. Deretter ble 350 µl løsning III tilsatt, røret ble snudd umiddelbart, og en hvit utfelling ble dannet. Løsningen ble sentrifugert ved 13 000 x g i 10 minutter. Supernatanten ble overført til en HiBind® kolonne. Denne ble først ekvilibrert med 100 µl ekvibreringsbuffer som ble sentrifugert ved 13 000 x g i 1 minutt. Oppsamlingsrøret ble tømt. 500 µl HBC buffer ble tilsatt for å vaske kolonnen som deretter ble sentrifugert ved 13 000 x g i 1 minutt. Oppsamlingsrøret ble igjen tømt, og 700 µl DNA vaskebuffer ble tilsatt kolonnen etterfulgt av sentrifugering ved 13 000 x g i 1 minutt. Oppsamlingsrøret ble tømt, og den tomme kolonnen ble sentrifugert i 2 minutter ved 13 000 x g for å tørke kolonnematriksen. HiBind® kolonnen ble deretter plassert i et rent eppendorfrør, og 30 µl elueringsbuffer ble tilsatt kolonnen. Kolonnen ble sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 x g. Renset plasmid ble oppbevart ved -20 °C.

### **3.1.3 Bestemmelse av DNA konsentrasjon**

Konsentrasjonen til det isolerte plasmidet ble bestemt ved bruk av Qubit® dsDNA BR Assay Kit. Metoden er selektiv for dobbeltrådet DNA og kan bestemme nøyaktig DNA konsentrasjon fra 100 pg/µl til 1,000 ng/µl. Forurensinger som salter, frie nukleotider og proteiner har liten innvirkning på analyseresultatet (ThermoFisher).

Materialer:

- Isolert plasmid
- Qubit® fluorometer
- Qubit® dsDNA BR Assay Kit

Metode:

En arbeidsløsning bestående av 199 µl Qubit® dsDNA BR buffer og 1 µl Qubit® dsDNA BR reagent ble laget for hver prøve som skulle analyseres. 198 µl arbeidsløsning og 2 µl isolert plasmid ble overført til et Qubit® analyserør. Prøvene ble vortexet og inkubert 2 minutter i romtemperatur før DNA konsentrasjonen ble målt med Qubit® fluorometeret. Det ble benyttet en tidligere laget standardkurve.

### **3.1.4 Transformering av plasmid inn i TOP10 celler**

Isolert plasmid ble transformert inn i One Shot® TOP10 celler. Disse cellene har en høy transformasjonseffektivitet og er godt egnet til å ta opp fremmed DNA (ThermoFisher).

Materialer:

- One Shot® TOP10 *E. coli* celler
- Isolert plasmid
- SOC-medium
- LB-agarplater (100 µg/ml ampicillin)

Metode:

Rør med One Shot® TOP10 *E. coli* celler ble tint forsiktig på is. 1 µl isolert plasmid med en konsentrasjon på 10 ng/µl ble overført til de superkompetente cellene og inkubert på is i 30 minutter. Deretter ble cellene varmebehandlet ved 42 °C i 30 sekunder før de ble inkubert på is i 2 minutter. 250 µl SOC-medium, forvarmet til 42 °C, ble tilsatt cellene som videre ble inkubert i 1 time ved 37 °C og 200 rpm. Deretter ble cellene platet ut på LB-agarplater; en plate med 50 µl og en med 150 µl. Platene ble inkubert ved 37 °C over natt.

### **3.1.5 Oppdyrking av One Shot® TOP10 *E. coli* celler**

Transformanter må dyrkes opp før isolering av plasmid fra One Shot® TOP10 *E. coli* celler. En koloni fra LB-agarplaten ble selektert og oppdyrking av transformerte One Shot® TOP10 *E. coli* celler ble utført som beskrevet i avsnitt 3.1.1

### **3.1.6 Isolering av plasmid fra One Shot® TOP10 *E. coli* celler**

Isolering av plasmid ble utført som beskrevet i avsnitt 3.1.2

### **3.1.7 Bestemmelse av DNA konsentrasjon av plasmid isolert fra One Shot® TOP10 *E. coli* celler**

Bestemmelse av DNA konsentrasjonen av plasmid isolert fra One Shot® TOP10 *E. coli* celler ble utført som beskrevet i avsnitt 3.1.3.

### **3.1.8 Transformering av plasmid inn i One Shot® BL21 *E. coli* celler**

Isolert plasmid ble transformert inn i One Shot® BL21 Star (DE3) celler som beskrevet i avsnitt 3.1.4. Disse cellene har en noe lavere transformasjonseffektivitet enn One Shot® TOP10 cellene, men er laget for å gi høyt proteinuttrykk (ThermoFisher)

### **3.1.9 Oppdyrking av One Shot® BL21 *E. coli* celler**

Transformerte One Shot® BL21 *E. coli* celler ble dyrket opp før tillaging av frysestock. Dette ble utført som beskrevet i avsnitt 3.1.1.

### **3.1.10 Tillaging av frysestocker**

Frysestocker ble tillaget for langtidsoppbevaring ved -80 °C.

Materialer:

- Cellekultur
- Glycerol

Metode:

1050 µl av cellekulturen overføres til et cryorør og tilsettes 450 µl autoklavert 87 % glyserol. Frysestockene oppbevares ved -80 °C.

## **3.2 Utrykking av enzymer**

Kitinasene ChiB WT, ChiB W220A og ChiB W97A/W220A samt LPMOene CBP21 og Cels2 har blitt uttrykt i dette prosjektet.

### **3.2.1 Overekspresjon**

*E. coli* ble benyttet som vertsorganisme for uttrykking av enzymene i denne oppgaven. Celler med ønsket plasmid ble dyrket i LB-medium tilsatt ampicillin for å hindre vekst av uønskede bakterier.

Materialer:

- LB-medium
- Ampicillin (100 mg/mL)
- Frysestock med ønsket bakteriestamme

Metode:

500 mL LB-medium ble overført til en 2 L dyrkningskolbe, tilsatt 250 µL ampicillin og inokulert med celler fra ønsket frysestock. Dette ble utført i sterilskap. Cellekulturene ble inkubert ved 37 °C og 200 rpm i 16-24 timer avhengig av vekst.

### 3.2.2 Periplasmatisk ekstrakt

Periplasma er området mellom den indre- og den ytre cellemembranen i gram-negative bakterier. Enzymene som produseres i denne oppgaven transporteres til periplasmaen. For å ekstrahere proteinene fra periplasmaen benyttes en spheroplastbuffer med høy sukkerkonsentrasjon som cellene kan ta opp. Cellene gis deretter et osmotisk sjokk ved at det tilsettes iskaldt vann og magnesiumklorid som gjør at det periplasmatiske ekstraktet frigjøres. Proteasehemmeren PMSF og den kjelaterende agenten EDTA hinder proteindegradering.

Materialer:

- Cellekultur
- Spheroplastbuffer
- Vann, 4 °C
- MgCl<sub>2</sub>
- PMSF

Metode:

Cellene ble høstet i en Avanti™ J-25 sentrifuge med JA-10 rotor ved 8000 rpm og 4 °C i 10 minutter. Cellepelletene ble resuspendert i 25 ml spheroplastbuffer og inkubert i 5 minutter på is. Deretter ble løsningen sentrifugert i en Eppendorf 5430 R sentrifuge ved 4 °C og 7830 rpm i 10 minutter. Supernatanten ble dekantert og pelleten inkubert 10 minutter i romtemperatur. Videre ble cellepelleten resuspendert i 15 ml vann, inkubert på is i 45 sekunder og tilsatt 1.5 mL 1M MgCl<sub>2</sub> (20 mM MgCl<sub>2</sub> ved CBP21). Løsningen ble igjen sentrifugert ved 4 °C og 7830 rpm i 10 minutter. Supernatanten ble sterilfiltrert med et 0.22 µm sterilfilter. 2 µL 50

mM PMSF ble tilsatt per ml periplasmatisk ekstrakt dersom det skulle lagres. Det periplasmatiske ekstrakter ble lagret ved 4 °C frem til rensing.

### **3.3 Rensing av enzymer**

For å studere enzymer er det helt essensielt og rensse enzymene før forsøk. Kitinasene ChiB WT, ChiB W220A og ChiB W97A/W220A og LPMOen CBP21 ble rensset med affinitetskromatografi på kitinkuler. Rensingen av LPMOene CelS2 og NcLPMO9C ble utført med to rensetrinn. CelS2 ble rensset med ionebytterkromatografi med svak anion bytter og størrelsesekklusjonskromatografi (SEC). NcLPMO9C ble rensset med ionebytterkromatografi med sterk kation bytter og hydrofob interaksjonskromatografi (HIC).

#### **3.3.1 Rensing av ChiB, Affinitetskromatografi**

Proteiner har ofte spesifikke interaksjoner og høy affinitet for kjemiske grupper eller molekyler (Tymoczko J. L. et al. 2013). Affinitetskromatografi utnytter den meget spesifikke interaksjonen mellom protein og ligand, og fordi proteiner forekommer i komplekse matrikser forenkler det analysen å utnytte affiniteten til proteiner (Miller 2005). Liganden til proteinet benyttes som stasjonærfase, proteinet binder seg til liganden og de uønskede komponentene går igjennom kolonnen. Deretter endres pH eller ionestyrke slik at interaksjonen mellom ligand og protein svekkes og det bundne proteinet elueres. Protein av interesse kan også elueres med tilsetning av et stort overskudd av ligand (Tymoczko J. L. et al. 2013).

Materialer:

- Kitinkuler
- Buffer A: 50 mM Tris-HCl pH 8.0
- Buffer B: 20 mM eddiksyre
- 20 % EtOH
- Periplasmatisk ekstrakt

Metode:

Det periplasmatiske ekstraktet ble justert til 50 mM Tris-HCl pH 8.0. Kolonnen ble pakket med 5-10 ml kitinkuler. Mobilfasehastigheten ble satt til 2.5 ml/min og buffer A ble applisert til baselinjen ble stabil. Deretter ble det periplasmatiske ekstraktet påsatt kolonnen. 30 til 40 ml ble påsatt i hver runde for ikke å overbelaste kolonnen. Videre ble buffer A påsatt til

baselinjen ble stabil for å vaske ut proteinene som ikke bandt til kolonnen. Til slutt ble mobilfasen 20 mM eddiksyre benyttet for å eluere CBP21. Kolonnen ble avslutningsvis vasket med 20 % EtOH. Fraksjoner av interesse analyseres med natriumdodecylsulfat polyacrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) beskrevet i avsnitt 3.3.2.

### **3.3.2 Natriumdodecylsulfat polyacrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)**

Elektroforese er bevegelse av en ladet partikkel i et elektrisk felt. SDS-PAGE separerer proteiner basert på forholdet mellom ladning og masse og kan benyttes til å estimere molekylvekt og renheten av proteiner. En gel av polyakrylamid benyttes som en matriks som proteiner vandrer igjennom når et elektrisk felt appliseres. Porestørrelsen på gelen er med på å bestemme vandringshastigheten. Hastighet og avstand et protein vandrer i en gel er også avhengig av styrken på det elektriske feltet, netto ladning på proteinet og strukturen (Tymoczko J. L. et al. 2013). Natriumdodecylsulfat (SDS) tilsettes proteinløsningen før applisering på gel. SDS denaturerer proteinene og binder med en konstant ratio på 1.4 g SDS per gram protein og gir proteinet en uniform negativ ladning og dermed samme forhold mellom ladning og masse (Farrell & Taylor 2006). Mellom cysteiner i proteiner kan det dannes disulfidbindinger som bidrar til proteinets struktur. For å denaturere proteiner må disulfidbindingene brytes, noe som gjøres ved tilsetning av en reduserende agent, for eksempel  $\beta$ -mercaptoetanol eller dithiothreitol. Varmebehandling bidrar også til denaturering. Denaturerte proteiner med konstant ladning til masse forhold separeres i henhold til masse. Uten forbehandling ville proteiner separeres på grunnlag av naturlig struktur og naturlig ladning og den analytiske verdien av separasjonen vil ikke være like stor. Molekyler med liten masse vil vandre lengre enn molekyler med stor masse. Etter endt separering kan proteinene visualiseres med fargestoffet Coomassie brilliant blue R-250 (Tymoczko J. L. et al. 2013). En standard proteinløsning sammenlignes med prøven for å estimere molekylvekt.

Materialer:

- Benchmark <sup>TM</sup> protein ladder
- NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel 1,0 mm x 10 brønner
- MOPS (1x) eller MES (1x)
- Fargeløsning
- Avfargingsløsning
- Arbeidsløsning

Metode:

10 µl arbeidsløsning og 10 µl proteinløsning ble blandet i ett eppendorfrør. Prøven ble denaturert ved 70 °C i 10 minutter. Gelen ble montert i gelelektroforesekammeret, og kammeret ble fylt med 1x MOPS (NcLPMO9C og ChiB) eller 1 x MES (CBP21 og CelS2). 7.5 µl Benchmark™ protein ladder og 20 µl proteinprøve ble applisert. Elektroforesen ble utført ved 200 V i 50 minutter. Gelen ble overført til en plastboks og fargeløsning ble helt over før den ble varmet i mikrobølgeovn i 1 minutt. Deretter ble gelen inkubert i 5 minutter på ristebrett før fargeløsningen ble helt av og gelen ble skylt med destillert vann. Avfargingsløsning ble deretter helt over gelen etterfulgt av 1 minutt oppvarming i mikrobølgeovn og 5 minutter inkubering på ristebrett. Avfargingsprosessen ble gjentatt en gang, og løsningen ble inkubert til proteinbåndene ble tydelige. Avfargingsløsning ble helt av og gelen oppbevart i destillert vann frem til visualisering med Gel Doc EZ Imager.

### **3.3.3 Rensing av CBP21, Affinitetskromatografi**

Rensing av CBP21 på kitinkuler ble utført som beskrevet i avsnitt 3.3.1, men det periplasmatiske ekstraktet ble justert til 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M ammoniumsulfat. Buffer A bestod av 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M ammoniumsulfat. Renheten etter rensingen ble undersøkt med SDS-PAGE beskrevet i avsnitt 3.3.2.

### **3.3.4 Rensing av CelS2, Ionebytterkromatografi med svak anionbytter**

Proteiner separeres på grunnlag av ulik netto ladning i ionebytterkromatografi. Kolonnen HiTrap DEAE FF fra GE Healthcare er en svak anionbytter og ble benyttet i første rensetrinn for CelS2. En svak anionbytter har en positivt ladd stasjonærfase, i dette tilfellet en dietylamoetyl gruppe bundet til agarose (GE Healthcare Life Sciences). Molekyler med negativ ladning vil interagere med stasjonærfasen og få lengre retensjonstid enn molekyler uten negativ ladning. Svake anionbyttere har et smalere pH område hvor stasjonærfasen er ladet og aktiv enn sterke anionbyttere. Proteiner bundet til stasjonærfasen elueres med økende ionestyrke eller økende pH i mobilfasen. En anionbytter separerer proteiner med ulik netto ladning (Tymoczko J. L. et al. 2013).

Materialer:

- HiTrap DEAE FF
- Buffer A: 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- Buffer B: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl
- 20 % EtOH
- Periplasmatisk ekstrakt

Metode:

Det periplasmatiske ekstraktet ble justert til pH 7.5 før applisering på kolonnen. Hastigheten på mobilfasen ble satt til 3.5 ml/min. Kolonnen ble først vasket med 20 % EtOH før buffer A ble påsatt til baselinjen ble stabil. Buffer B ble deretter benyttet for å fjerne urenheter og ble påsatt til stabil baselinje før kolonnen ble ekvilibrert med buffer A. Deretter ble det periplasmatiske ekstraktet applisert. Maksimalt 50 ml prøve ble påført for ikke å overbelaste kolonnen. Etter applisering av prøve ble buffer A påsatt til stabil baselinje. For å eluere CelS2 ble en lineær gradient med 0 – 50 % buffer B over 50 minutt benyttet. Fraksjoner på 7 ml ble samlet. Etter endt gradient ble 100 % buffer B applisert inntil baselinjen var stabil. Avslutningsvis ble 20 % EtOH benyttet for å vaske kolonnen. Fraksjoner av interesse ble analysert med SDS-PAGE som beskrevet i avsnitt 3.3.2 før videre rensing med størrelsesekslusjonskromatografi (SEC).

### 3.3.5 Oppkonsentrering

CelS2 oppkonsentreres før størrelsesekslusjonskromatografi. Sentrifugerør med en membran som skiller partikler basert på størrelse ble benyttet. Macrosep® Advance 30K ble benyttet i oppkonsentrering av CelS2 og har porestørrelse som separerer partikler på 30kDa. Partikler mindre enn den gitte størrelsen går gjennom filteret, mens større partikler blir værende igjen over membranen (PALL Life Sciences 2010).

Materialer:

- Macrosep® Advance 30K
- Renset enzym



Metode:

Renset proteinløsning ble overført til Macrosep® Advance 30K og sentrifugert ved 4300 rcf og 4 °C til volumet over membranen var cirka 1 ml. Oppkonsentrert proteinløsningen ble overført til et cryorør og lagret ved 4 °C.

### **3.3.6 Rensing av CelS2, Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC)**

Proteiner separeres på grunnlag av størrelse i størrelseseksklusjonskromatografi. Uløselige polymerer som for eksempel dextran, agarose eller polyarylamid benyttes som kolonnemateriale. Kolonnematerialet består av porer med en bestemt størrelse. Små molekyler kan diffundere inn i porene mens større molekyler ikke har mulighet til dette og blir ekskludert. Som følge av dette vil store molekyler ha kortere retensjonstid enn små molekyler (Miller 2005). Kolonnen HiLoad 16/600 Superdex 75 pg fra GE Healthcare ble benyttet i andre rensetrinn av CelS2. Den består av kovalent bundet dextran til kryssbundet agarose og gir god separasjon av molekyler med molekylvekt mellom 3000 og 70 000 Da (GE Healthcare Life Sciences).

Materialer:

- HiLoad 16/600 Superdex 75 pg
- Buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 M NaCl
- dH<sub>2</sub>O
- 20 % EtOH
- Oppkonsentrert proteinløsning

Metode:

Mobilfasehastighet lik 1 ml/min ble benyttet. Først ble kolonnen vasket med dH<sub>2</sub>O i 20 minutter. Deretter ble kolonnen ekvilibrert med 1 kolonnevolum (120 ml) buffer. Oppkonsentrert proteinløsning fra avsnitt 3.3.5 ble filtrert med Ultrafree® MC 0.22 µm sentrifugefilter ved 4 °C og 12 000 x g for å fjerne partikler før applisering på SEC-kolonnen. Mellom 1 og 2 ml prøve ble applisert med sprøyte. Etter applisering av prøven ble proteinet eluert med ett kolonnevolum buffer. Fraksjoner på 2 ml ble samlet. Kolonnen ble deretter vasket i 20 minutter med dH<sub>2</sub>O før 2 kolonnevolum 20 % EtOH ble applisert. Fraksjoner av interesse ble analysert med SDS-PAGE beskrevet i avsnitt 3.3.2.

### **3.3.7 Rensing av NcLPMO9C, Ionebytterkromatografi sterk kationbytter**

Kolonnen HiTrap SP HP er en sterk kationbytter med en sulfopropylgruppe bundet til stasjonærfasen. Sulfopropyl gruppen er negativt ladet over et stort pH område og er dermed en sterk kationbytter (GE Healthcare Life Sciences). Proteiner elueres ved endring av saltkonsentrasjon eller pH (Farrell & Taylor 2006).

Materialer:

- HiTrap SP HP
- Buffer A: 50 mM Natriumacetatbuffer pH 4.0
- Buffer B: 50 mM Natriumacetatbuffer pH 4.0, 1 M NaCl
- 20 % EtOH
- Celleekstrakt

Metode:

50 ml celleekstrakt som inneholdt NcLPMO9C fra tidligere forskningsprosjekter ved NMBU ble tint på vannbad ved 20 °C. pH ble justert til 4.0 med konsentrert eddiksyre. Deretter ble løsningen sentrifugert ved 4 °C og 12000 x g i 15 minutter for å fjerne partikler. Tre kolonner HiTrap SP HP ble koblet sammen. Mobilfasehastigheten ble satt til 2.5 ml/min. Først ble kolonnen vasket med 20 % EtOH, Buffer A ble påsatt til baselinja var stabil. Kolonnen ble deretter vasket med buffer B før kolonnen ble ekvilibrert med buffer A. Deretter ble 50 ml celleekstrakt applisert på kolonnen etterfulgt av buffer A for å vaske ut komponenter som ikke binder til kolonnen. En lineær gradient med 0 – 70 % buffer B over 150 ml ble videre benyttet for å eluere proteiner bundet til kolonnen. Fraksjoner på 4 ml ble samlet. Etter endt gradient ble 100 % buffer B benyttet for å eluere resterende proteiner. Til slutt ble kolonnen vasket med 20 % EtOH. Fraksjoner av interesse ble analysert med SDS-PAGE om beskrevet i avsnitt 3.3.2 før videre rensing med hydrofob interaksjonskromatografi (HIC).

### **3.3.8 Rensing av NcLPMO9C, Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)**

HIC separerer proteiner med ulike hydrofobisitet. Stasjonærfasen er upolar og hydrofob. HiTrap phenyl HP fra GE Healthcare har en stasjonærfase bestående av fenylgrupper (GE Healthcare Life Sciences). Mobilfasen inneholder salt, og eluering av proteiner bundet til stasjonærfasen skjer ved en gradient med synkende saltkonsentrasjon. Høy konsentrasjon av salt øker hydrofobisiteten til proteiner og gir dermed en sterkere interaksjon med stasjonærfasen (Miller 2005). Proteiner trenger vannmolekyler for å være løselige. Ved

økende saltkonsentrasjon konkurrerer salt og proteiner om vannmolekyler (Tymoczko J. L. et al. 2013). De mest hydrofobe proteinene har høyere retensjonstid enn mindre hydrofobe proteiner.

Materialer:

- HiTrap Phenyl HP
- Buffer A: 50 mM Natriumacetatbuffer pH 5.7, 35 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Buffer B: 50 mM Natriumacetatbuffer pH 5.7
- $\text{dH}_2\text{O}$
- 20 % EtOH

Metode:

Fraksjoner som inneholdt NcLPMO9C fra avsnitt 3.3.7 ble samlet og under magnetrøring tilsatt ammoniumsulfat til en konsentrasjon lik 130 mg/ml  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Tre kolonner HiTrap Phenyl HP ble koblet sammen. Mobilfasehastigheten ble satt til 2.5 ml/min. Først ble kolonnen vasket med 20 % EtOH og deretter  $\text{dH}_2\text{O}$  til baselinja ble stabil. Videre ble kolonnen påsatt buffer A etterfulgt av buffer B før den til slutt ble ekvilibrert med buffer A. Mobilfase ble endret når baselinjen var stabil. Prøven ble applisert etterfulgt av 20 % buffer B for å vaske bort komponenter som ikke har bundet til kolonnen. NcLPMO9C ble eluert med en lineær gradient fra 20 – 100 % buffer B over 250 ml. Fraksjoner på 5 ml ble samlet. Etter endt gradient ble først buffer A og deretter  $\text{dH}_2\text{O}$  påsatt kolonnen til stabil baselinje. Rensingen ble avsluttet med at kolonnen ble vasket med 20 % EtOH. Renheten til fraksjonene ble analysert med SDS-PAGE beskrevet i avsnitt 3.3.2.

### **3.3.9 Bytte av buffer**

Før eksperimenter og ved lagring av rensede enzymer kan det være behov for bytte av buffer. Amicon® Ultra-15 10K og Macrosep® Advance 30K, som separerer partikler med henholdsvis 10kDa og 30kDa, benyttes og prinsippet er beskrevet i avsnitt 3.3.5 om oppkonsentrering.

Materialer:

- Amicon® Ultra-15 10K eller Macrosep® Advance 30K
- Renset enzym
- Lagringsbuffere:
  - 100 mM TrisHCl pH 8.0, ChiB
  - 50 mM Natriumacetat pH 6.10, CBP21
  - 50 mM TrisHCl pH 7.5, CelS2
  - 20 mM MES pH 6.0, NcLPMO9C

Metode:

Renset proteinløsning ble overført til sentrifugefilteret og fylles med lagringsbuffer. Sentrifugefilteret ble sentrifugert ved 4300 rcf og 4 °C til volumet over membranen var 2 til 3 ml. Løsning som går gjennom membranen ble fjernet, og ny lagringsbuffer ble tilsatt over membranen og sentrifugert ved 4300 rcf og 4 °C. Dette trinnet ble gjentatt 4 ganger for å sikre at all buffer ble byttet. Til slutt ble proteinløsningen overført til et cryorør og lagret ved 4 °C.

### 3.3.10 Bestemmelse av proteinkonsentrasjon

#### 3.3.10.1 $A_{280}$

Konsentrasjonen av CBP21, CelS2 og NcLPMO9C ble bestemt med  $A_{280}$ . De aromatiske aminosyrene tryptofan og tyrosin absorberer elektromagnetisk stråling med bølgelengde på 280 nm. Absorpsjon ved 280 nm kan benyttes til å bestemme proteinkonsentrasjon med et spektrofotometer. Beer-Lamberts lov relaterer absorbansen av monokromatisk lys til konsentrasjon, lengden på lysveien gjennom løsningen og ekstinksjonskoeffisienten og kan benyttes for å bestemme konsentrasjonen til rensed protein. Likning 2 viser Beer-Lamberts lov (Farrell & Taylor 2006).

Likning 2:  $A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda}lc$

$A_{\lambda}$  er absorbans ved bølgelengde  $\lambda$ ,  $\epsilon_{\lambda}$  er ekstinksjonskoeffisienten ved bølgelengde  $\lambda$ ,  $l$  er lysveien gjennom løsningen og  $c$  er konsentrasjonen.

Ekstinksjonskoeffisienten,  $\epsilon_{\lambda}$ , til ulike proteiner beregnes med ExPASy ProtParam tool (ExPASy).

Tabell 3.1: Ekstinksjonskoeffisienter for LPMOene CBP21, NcLPMO9C og CelS2.

Enzym	Ekstinksjonskoeffisient ( $\text{cm}^{-1} \text{ M}$ )
CBP21	35000
NcLPMO9C	47000
CelS2	75775

Materialer:

- UVetter
- Enzymløsning
- Lagringsbuffer (se avnitt 3.3.9)
- AG Biophotometer

Metode:

100  $\mu\text{l}$  lagringsbuffer ble overført til en UVette og benyttet som blankprøve. Enzymløsningen ble fortynnet 100x i lagringsbuffer, og absorbansen ved 280 nm ble målt slik at  $0 < A_{280} < 1$ . Konsentrasjonen til enzymet ble beregnet med likning 1.

### 3.3.10.2 Bradford

Konsentrasjonen av ChiB WT, ChiB W220A og ChiB W97A/W220A ble bestemt med bradfordmetoden. Bradfordmetoden utnytter fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250 til å måle proteinkonsentrasjon. Coomassie Brilliant Blue G-250 har negativt ladete sulfonatgrupper som binder seg til positivt ladde grupper på proteinet. Fritt Coomassie Brillinat Blue G-250 har absorpsjonsmaksimum ved 465 nm, men i kompleks med protein endres absorpsjonsmaksimumet til 595 nm. Absorpsjon ved 595 nm benyttes til bestemmelse av proteinkonsentrasjon (Farrell & Taylor 2006). Mengde protein bestemmes ut fra en standardkurve.

Materialer:

- Proteinløsning
- Lagringsbuffer (se avnitt 3.3.9)
- BioRad Protein Assay Dye Reagent
- AG Biophotometer

Metode:

Proteinkonsentrasjon bestemmes med gjennomsnittet av tre paralleller. Proteinløsningen ble fortynnet 160x i lagringsbufferen til et sluttvolum på 800µl. En blankprøve med 800 µl lagringsbuffer ble også laget. 200 µl Biorad Protein Assay Dye Reagent ble tilsatt alle prøvene, inkludert blankprøven. Prøvene ble vortexet og inkubert 5 minutter i romtemperatur før absorbansen ved 595 nm ble målt. Metoden har kalibreringskurve med lineært område fra 1.25 µg/ml til 10 µg/ml bovine serum albumin.

## 3.4 Kitin depolymerisering

### 3.4.1 Aktivitetsassay

Enzymene ChiB WT, ChiB W220A, ChiB W97A/W220, HCHT-50 WT, HCHT-39 WT, HCHT-50 W31A, HCHT-50 W99A og HCHT-50 W218A, sin evne til å bryte ned β-kitin ble undersøkt. Hastigheten til enzymene ble sammenlignet ved å tilpasse grad av degradering over tid til en kinetisk to-parameter modell foreslått av Kostylev og Wilsons (Kostylev & Wilson 2013) Grad av degradering ble bestemt ved å kvantifisere produktene, *N*-acetylglukosamin og *N,N*-diacetylkitobiose, etter enzymatisk nedbryning med HPLC. Prøvene sonikeres før tilsetning av enzym. Sonikering fører til dekrystallisering av substratet og gjør endene i kitin krystallen mer tilgjengelig for kitinasene. Forsøket utføres under betingelser hvor enzymene er mettet med substrat.

Materialer:

- 50 mM natriumacetatbuffer pH 6.1
- 180 µm β-kitin
- Kitinase
- 20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Metode:

20 mg/ml  $\beta$ -kitin i 50 mM natriumacetatbuffer pH 6.1 ble sonikert i 20 minutter. Deretter ble prøvene inkubert ved 37 °C og 800 rpm i 10 minutter før ønsket kitinase ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon lik 100 nM. Før tilsetting av kitinase ble en nullprøve tatt ut. Prøver ble tatt ut hver time i 7 timer. 75  $\mu$ l prøve ble blandet med 75  $\mu$ l 20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for å stoppe reaksjonen. Prøvene ble filtrert gjennom et 0.45  $\mu$ m Duapore Membran filter og overført til HPLC-rør. Prøvene ble lagret ved -20 °C frem til analyse.

### 3.4.2 Metting av LPMOer med Cu<sup>2+</sup>

Kobber er essensielt for aktiviteten til LPMOer, og enzymene ble derfor mettet med kobber før anvendelse i forsøk. PD MiniTrap™ G-25 og PD MidiTrap™ G-25 kolonner benyttes for å fjerne overskudd av CuSO<sub>4</sub> etter metningsreaksjonen. Kolonnen inneholder sephadex™ materiale med samme virkingsprinsipp som SEC (avsnitt 3.3.6) og skiller forbindelser med høy molekylvekt fra forbindelser med lav molekylvekt (GE Healthcare Life Sciences). Den eneste forskjellen mellom de to kolonnene er kolonnevolumet.

Materialer:

- LPMO
- CuSO<sub>4</sub>
- PD MiniTrap™ G-25 eller PD MidiTrap™ G-25
- Lagringsbuffer (se avnitt 3.3.9)

Metode:

PD MidiTrap™ G-25 kolonne: Renset LPMO ble inkubert i 30 minutter i romtemperatur med en 3 ganger molarkonsentrasjon av CuSO<sub>4</sub> i forhold til LPMO. Totalvolumet var 300  $\mu$ l. Kolonnen ble ekvilibrert tre ganger med 5 ml lagringsbuffer. Deretter ble LPMO-CuSO<sub>4</sub> løsningen applisert på kolonnen, etterfulgt av 700  $\mu$ l lagringsbuffer. Kobbermettet LPMO ble eluert i 2 fraksjoner. 1000  $\mu$ l lagringsbuffer ble først applisert på kolonnen. Dette gir fraksjon 1 som ble samlet opp i eppendorfrør. Deretter ble 500  $\mu$ l lagringsbuffer applisert. Dette resulterte i fraksjon 2. Kobbermettet LPMO eluerte i fraksjon 1. Proteinkonsentrasjonen i ønsket fraksjon ble målt med A<sub>280</sub>.

PD MiniTrap™ G-25 kolonnen: En 3 ganger molar konsentrasjon av  $\text{CuSO}_4$  i forhold til LPMO ble inkubert i 30 minutter i romtemperatur. Kolonnen ble ekvilibrert med 8 ml lagringsbuffer. LPMO- $\text{CuSO}_4$  og lagringsbuffer ble applisert på kolonnen til et totalvolum lik 500  $\mu\text{l}$ . Kobbermettet LPMO ble eluert ved tilsetning av 200  $\mu\text{l}$  lagringsbuffer fem ganger. Det kobbermettede enzymet eluerte i fraksjon 2. Proteinkonsentrasjonen i ønsket fraksjon ble målt med  $A_{280}$ .

### **3.4.3 Aktivitetsassay med CBP21**

For å studere effekten CBP21 har på kitinnedbrytning ble det utført nedbrytningsforsøk med tilsats av CBP21 og askorbinsyre. Etter sonikering og 10 minutters inkubasjon ble CBP21 mettet med kobber tilsatt til en konsentrasjon på 1  $\mu\text{M}$  og askorbinsyre til en konsentrasjon på 2 mM. Forsøk med 50  $\mu\text{M}$  askorbinsyre og 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ble også utført. Reaksjonsblandingen ble inkubert ved 37 °C og 800 rpm i 2 timer og 30 minutter før kitinase ble tilsatt. Det ble tatt ut en nullprøve før tilsetning av CBP21 og askorbinsyre i tillegg til en umiddelbart før tilsetning av kitinase. Resten av assayet ble utført som beskrevet i avsnitt 3.4.1.

### **3.4.4 High performance liquid chromatography (HPLC)**

HPLC separerer ulike molekyler basert på interaksjon med to ulike faser, stasjonærfase og mobilfase. Molekylers ulike affinitet for disse to fasene muliggjør separasjon. Dette fører til at ulike molekyler bruker ulik tid for å passere gjennom kolonnen. Molekylene får ulik retensjonstid. HPLC skjer under høyt trykk noe som fører til raskere analyse, høyere oppløsning, høyere sensitivitet og høyere nøyaktighet (Miller 2005).

HPLC-systemet Dionex Ultimate 3000 med UV deteksjon og kolonnen Rezex Fast Fruit  $\text{H}^+$  ble benyttet til analyse av produktene fra kitinnedbrytningen. Sulfonert styren-vinyl benzen (SDVB) er stasjonærfasen i Rezex Fast Fruit  $\text{H}^+$ -kolonnen. Svovelsyren som mobilfasen består av protonerer produktene som dermed blir positivt ladd. Analysemetoden er en type ionebytterkromatografi hvor  $\text{H}^+$ -ioner blir byttet ut med positivt ladede analytter noe som resulterer i ulike retensjonstider.



Materialer:

- Dionex Ultimate 3000
- Kolonne: Rezex RFO-Fast Fruit H+ 7.8 x 100 mm
- Forkolonne: Carbo-H 4 x 3.0 mm
- Mobilfase: 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Standarder:
  - Standard 1: 50 µM A1, 150 µM A2
  - Standard 2: 200 µM A1, 600 µM A2
  - Standard 3: 500 µM A1, 1500 µM A2

Metode:

8 µl prøve ble injisert på kolonnen. Analyttene ble separert ved isokratisk eluering, flow lik 1 ml/min og ved 85 °C. Produktene ble detektert ved en bølgelengde på 195 nm. Standarder som inneholdt monomer og dimer i ulike konsentrasjoner ble analysert, og en standardkurve ble laget for å kvantifisere mono- og dimerene i prøvene. Kromatogrammene ble analysert med programvaren Chromeleon.

### **3.4.5 Dataanalyse**

Programvaren Origin 7.0 ble benyttet i analyse av HPLC data. Graden av depolymerisering (%) plottes mot tid. A- og b-verdier kalkuleres med "non-linear curve fit" og modellen er beskrevet i avsnitt 1.12.

## **3.5 Selektiv hydrokarbonoksidasjon**

### **3.5.1 Aktivitetsassay**

Selektiv oksidering av ulike hydrokarboner med LPMOene CBP21, CelS2 og NcLPMO9C ble undersøkt. Hydrokarbonene metan, etan, isobutan, sykloheksan og propen ble benyttet som substrat. Betingelser som konsentrasjon av enzym, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, askorbat, CuSO<sub>4</sub> ble variert i forsøk på å oppnå optimale forhold for reaksjonen.

## Materialer:

- 50 mM natriumfosfatbuffer pH 7.0
- LPMO (CBP21, CelS2, NcLPMO9C)
- (+)-natrium L-askorbat
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- CuSO<sub>4</sub>
- Substrater: Metan, etan, isobutan, sykoheksan, propen.

## Metode:

En rekke ulike reaksjonsbetingelser ble forsøkt. Følgende beskriver en generisk prosedyre, og tabell 3.2 viser detaljene ved de ulike eksperimentene. dH<sub>2</sub>O, natriumfosfatbuffer, enzym og CuSO<sub>4</sub> ble blandet i et headspacerør. Prøve uten enzym ble benyttet som blankprøve. Forsøk hvor LPMO først ble mettet med kobber ble også utført. Når substratet var gass (metan, etan, isobutan og propen) ble rørene forseglet med et teflonbelagt septa med aluminiumsring før prøvene ble evakuert med en Schlenk linje i 2 minutter for å gjøre plass til substratet. Gassen ble tilført prøvene ved å stikke en nål gjennom septumet i 10 sekunder til det oppstod et merkbart trykk i headspacerørene. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og (+)-natrium L-askorbat ble tilsatt gjennom septumet med en Hamiltonsprøyte. Prøvene ble inkubert mellom 2 og 5 timer ved 30 °C og 120 rpm. Når sykoheksan ble brukt som substrat ble sykoheksan, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og (+)-natrium L-askorbat tilsatt før headspacerørene ble forseglet. Det var heller ikke nødvendig å evakuere prøvene. Prøvene ble oppbevart ved -20 °C frem til videre analyse. Alle reaksjonene ble utført i 50 mM natriumacetatbuffer pH 7.0. I forsøksoppsett 1 er LPMO-ene mettet med kobber. I forsøksoppsett 2 og 3 ble ikke LPMO-ene mettet med kobber og CuSO<sub>4</sub> ble i stedet tilsatt. Alle eksperimentene ble utført i triplikat.

Tabell 3.2: Detaljer angående reaksjonsbetingelsene for selektiv hydrokarbonoksidasjon.

Reaksjon	Reaksjonsblanding	Substrater	Spesifikasjon
<b>Forsøksoppsett 1</b>	[LPMO] = 10 $\mu$ M [Sykloheksan] = 10 $\mu$ M [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 1 mM [Askorbat] = 1 mM [CuSO <sub>4</sub> ] = 10 $\mu$ M [Kitin] = 1 mg/ml Totalvolum = 5 ml	Etan, Sykloheksan, Propen	Inkuberes i 4 timer
<b>Forsøksoppsett 2</b>	[LPMO] = 5 $\mu$ M [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 1 mM [Askorbat] = 250 $\mu$ M [CuSO <sub>4</sub> ] = 20 $\mu$ M Totalvolum = 10 ml	Etan	†: 250 $\mu$ M askorbat og 1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ekstra ble tilsatt etter 30 minutter. ‡: 50 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ble tilsatt med intervall på 15 minutt 5 ganger
<b>Forsøksoppsett 3a</b>	[CBP21] = 11 $\mu$ M [CeIS2] = 6.5 $\mu$ M [NcLPMO9C] = 11 $\mu$ M [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 100 $\mu$ M [Askorbat] = 100 $\mu$ M [CuSO <sub>4</sub> ] = 60 $\mu$ M Totalvolum 500 $\mu$ l	Metan, Isobutan, Etan	50 $\mu$ M askorbat og 200 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ekstra ble tilsatt etter 1 times inkubering. Prøvene ble deretter inkubert i 4 timer
<b>Forsøksoppsett 3b</b>	[CBP21] = 22 $\mu$ M [CeIS2] = 13 $\mu$ M [NcLPMO9C] = 22 $\mu$ M [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 100 $\mu$ M	Metan, Isobutan, Etan	100 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> og 10 $\mu$ M askorbat ekstra ble tilsatt etter 1 times

	[Askorbat] = 20 $\mu$ M [CuSO <sub>4</sub> ] = 60 $\mu$ M Totalvolum = 500 $\mu$ l		inkubering Prosedyren ble gjentatt 3 ganger med 1 times intervall
--	--	--	---

### 3.5.2 Gasskromatografi (GC)

Analyse av oksiderte derivater av hydrokarbonsubstratene ble gjennomført med headspace gasskromatografi. Metoden ble, med noen modifikasjoner, utført som tidligere beskrevet av Grønnevik et al. (Grønnevik et al. 2011). Gasskromatografi separerer komponenter med ulik affinitet for stasjonærfasen, og en bæregass benyttes for å forflytte prøven gjennom kolonnen. GC er en god teknikk for analyse av flyktige komponenter (Miller 2005).

Et 6890 GC system med en 7679A automatisk headspacesamplere koblet til en flammeionisasjonsdetektor ble benyttet i analysen av de oksiderte hydrokarbonene. Kolonnen CP-SIL 5CB GC har en stasjonærfase bestående av dimetylpolysiloxane og separerer komponenter basert på ulike kokepunkter og flyktighet. Helium benyttes som bæregass. Eksterne standardkurver for kvantifisering ble tillaget for sykloheksanol, sykloheksanon og propen oksid med konsentrasjoner på 50, 75, 100, 200, 300 og 500  $\mu$ M.

Materialer:

- 6890 GC system
- 7679A headspace autosampler
- Kolonne: CP-SIL 5CB GC 25 m x 0.53 mm x 5.0  $\mu$ m
- Bæregass: Helium

Metode:

Analyttene ble separert med en bæregasshastighet på 11.1 ml/min. Vilårene for headspaceflaskene var 60 °C med en forvarmingstid på 30 minutter. Headspaceflaskene ble trykksatt til 10 PSIG i 1.5 minutt før injeksjon og injeksjonstiden var 1 minutt. Følgende temperaturprogram ble benyttet under analysen: 53 °C i 1 minutt etterfulgt av en økning på 15 °C min<sup>-1</sup> over 2 min til 70 °C. Deretter ble temperaturen økt med 22 °C min<sup>-1</sup> over 3 min til 130 °C. Identifisering og kvantifisering av interessante komponenter ble gjennomført ved å kalibrere instrumentet med standardløsninger med kjent konsentrasjon av sykloheksanol,

sykloheksanon og propenoksid. Etanol, acetaldehyd, 2-metyl-1-propanol og 2-metylpropanon var optimalisert i tidligere forsøk.

## 3.6 In situ generering av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> med glukoseoksidase

### 3.6.1 Aktivitetsassay

Som nevnt tidligere strides om H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> er kosubstratet til LPMOer. Høye konsentrasjoner av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kan oksidere enzymets aktive sete og dermed inhibere enzymet. Generering av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fra glukose med enzymet glukoseoksidase i reaksjonsblandingen, in situ, vil bidra til kontrollert leveranse av kosubstrat til enzymet uten å hindre aktiviteten. Optimalisering av glukoseoksidase systemet er derfor av interesse for å øke enzymaktiviteten under mildere forhold. Konsentrasjonen av GOX og askorbinsyre er parametrene som varieres og optimaliseres. Alle eksperimentene ble utført i duplikat.

Materialer:

- 50mM Natriumacetatbuffer pH 6.10 / 50mM Bis-Tris pH 6.10
- CBP21
- 180 µm β-kitin
- Askorbinsyre
- Glukose
- Glukoseoksidase

Metode:

10 mg β-kitin ble tilsatt 50 mM Natriumacetatbuffer pH 6.10 til en konsentrasjon lik 20 mg/ml og sonikert i 20 minutter. Deretter ble prøvene inkubert ved 37 °C og 800 rpm. Etter 10 minutter ble CBP21 tilsatt til en konsentrasjon lik 1 µM og glukose til en konsentrasjon lik 15 mM. Reaksjonsblandingen ble deretter inkubert i 20 minutter ved 37 °C og 800 rpm før glukoseoksidase og askorbinsyre ble tilsatt for å starte reaksjonen. Konsentrasjonen av askorbinsyre og glukoseoksidase ble variert i ulike forsøk. Detaljene er vist i tabell 3.3. 75 µl prøve ble tatt ut og filtrert med et Duapore Membrane 0.45 µm filter. 20 µl av filtratet ble tilsatt kitobiase til en sluttkonsentrasjon lik 1 µM, for å danne dimere av oksiderte produkter. Prøvene ble inkubert ved 37 °C over natt. Deretter ble løsningen overført til HPLC-rør og tilsatt 78 µl acetonitril før analyse på HPLC.

Tabell 3.3: Detaljer angående varierende konsentrasjon av askorbinsyre og glukoseoksidase i ulike forsøk. Forsøk 1 og 2 ble utført i 50 mM natriumacetatbuffer pH 6.10, mens Forsøk 3 ble utført i 50 mM Bis-Tris pH 6.10.

	[Askorbinsyre] ( $\mu\text{M}$ )	[Glukoseoksidase] (ng/ml)
Forsøk 1:	50 (kontroll 2mM)	11.8, 29.5, 59, 118, 236
Forsøk 2:	0, 50, 200, 500, 1000, 2000	118
Forsøk 3:	200	11.8, 29.5, 59, 118, 236

### 3.6.2 High performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC systemet Agilent 1290 infinity ble benyttet i analyse av oksidiert *N,N'*-diacetylkitobiose (DP2ox). Kolonnen som benyttes retarderer polare forbindelser, inkludert karbohydrater og sukker. Stasjonærfasen er stabil i et stort pH område, og kan separere et bredt spekter av forbindelser med stor variasjon i polaritet, struktur og pKa- verdier (Waters). Analysemetoden krediteres til Loose et al (Loose et al. 2014).

Materialer:

- Agilent 1290 Infinity
- Buffer A: Acetonitil
- Buffer B: 15 mM Tris-HCl pH 8.0
- Kolonne: Acquity UPLC BEH amide 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1x50 mm
- Forkolonne: BEH amide 1.7  $\mu\text{m}$

Metode:

7  $\mu\text{l}$  prøve ble injisert på kolonnen. Mobilfasehastigheten ble satt til 0.4 ml/min. Følgende gradient ble benyttet: 78 % buffer A og 22 % buffer B i 4 minutter, deretter en gradient på 1 minutt til 62 % buffer A og 38 % buffer B. En gradient på 1 minutt tilbake til 78 % buffer A og 22 % buffer B ble deretter applisert og holdt i 1 min. UV- deteksjon ved 205 nm ble benyttet. Kromatogrammene ble analysert med programvaren Chromeleon.

## 4 Resultater

### 4.1 Residuanalyse av HCHT og ChiB

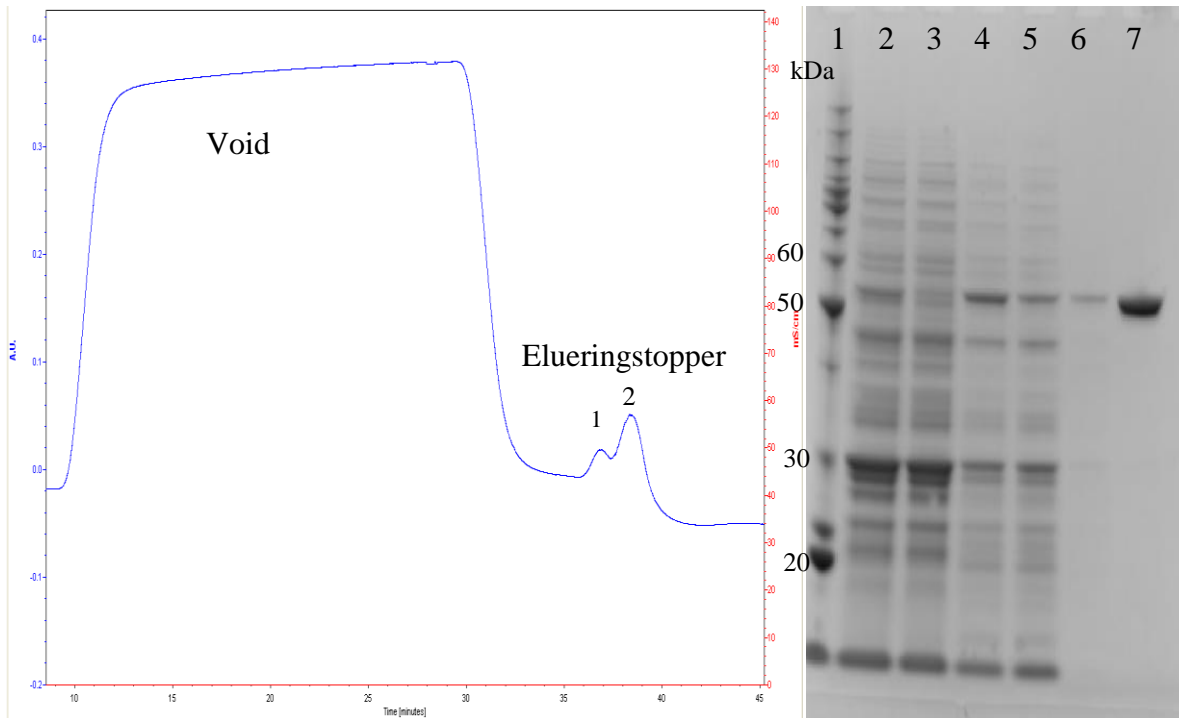
I denne oppgaven ble aktiviteten til kitinasene HCHT og ChiB, samt noen av deres tryptofan til alanin mutanter, undersøkt. Aromatiske residuer i det aktive setet til kitinaser har vist seg å ha viktige interaksjoner med substratet. Grad av depolymerisering, hastigheten til depolymeriseringen og prosessivitet er parametere som er avhengige av disse aromatiske aminosyrene. I følge nomenklaturen skjer hydrolysen mellom subsete -1 og +1 i det aktive setet. HCHT har to tryptofan residuer viktige for hydrolytisk aktivitet og prosessivitet som befinner seg i subsete -3, W31, og i subsete +2, W218 (Eide et al. 2016). W99 er plassert i subsete +1 og kan derfor inngå i dannelsen av den forvrengte konformasjonen til sukkerresiduet i subsete -1 i tillegg til å ha viktige bindingsinteraksjoner til substratet. Det aktive setet til ChiB inneholder også en rekke aromatiske aminosyrer som inngår i viktige interaksjoner med substratet. Det aktive setet deles inn i subseter fra -3 til +3 hvor W220 er plassert i subsete +2, mens W97 er plassert i subsete +1 (Horn et al. 2006). Begge er vist å være viktige for grad av prosessivitet for ChiB. W97 i ChiB kan ha samme rolle som W99 i HCHT. I denne oppgaven har forsøk med enzymene HCHT-39 WT, HCHT-50 WT og mutantene W31A, W218A, W99A samt ChiB WT og mutantene W220A, W97A/W220A blitt utført.

### 4.2 Rensing av enzymer

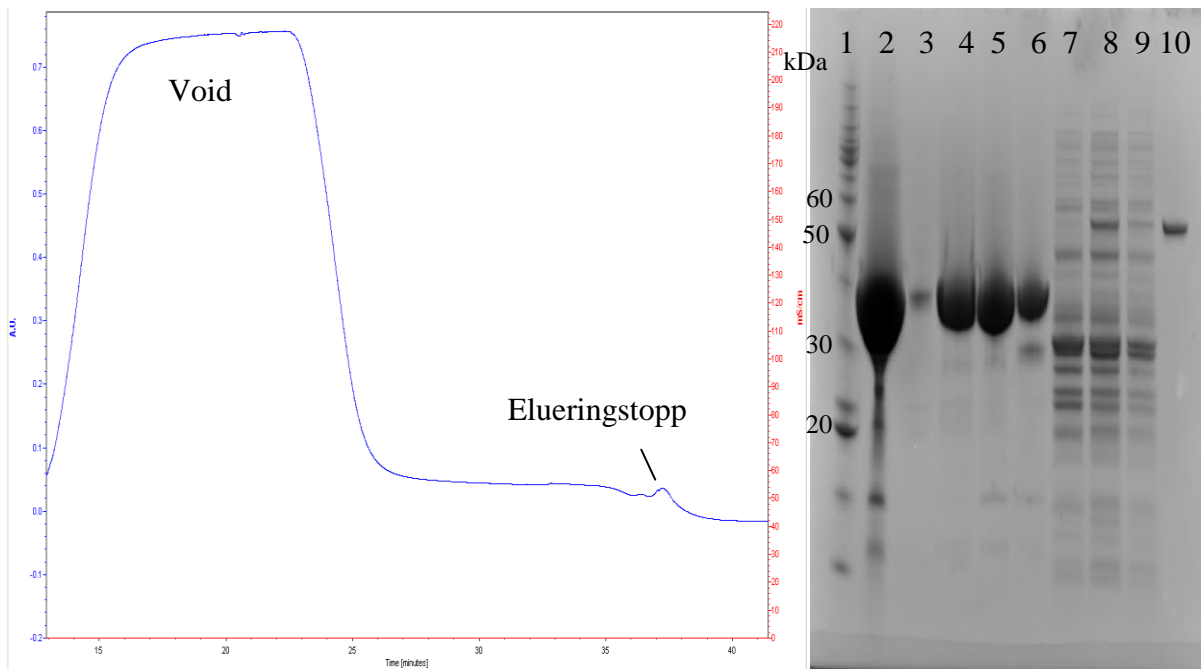
Celleekstrakt inneholdende de ulike enzymene, CBP21, CelS2, NcLPMO9C og ChiB med varianter, ble rensed med ulike kromatografiske metoder. CBP21 og ChiB ble rensed med affinitetskromatografi, CelS2 med ionebytterkromatografi og størrelseseksklusjonskromatografi og NcLPMO9C med ionebytterkromatografi og hydrofob interaksjonskromatografi. SDS-PAGE benyttes for å undersøke renheten til rensede proteiner. Følgende avsnitt viser kromatogram og SDS-PAGE av rensede enzymer.

#### 4.2.1 ChiB

Kromatogrammet og en SDS-PAGE gel etter rensing av ChiB W220A og ChiB W97A/W220A med affinitetskromatografi er vist i henholdsvis figur 4.1 og figur 4.2. ChiB har molekylvekt lik 55480 Da.



Figur 4.1: Kromatogram (venstre) og SDS-PAGE (høyre) for rensing av ChiB W220A på kitinkuler. Brønn 1 inneholder ladder, brønn 4 periplasmatisk ekstrakt, brønn 5 void, brønn 6 eluat 1 og brønn 7 eluat 2. Brønn 2 og 3 er fra andre forsøk.

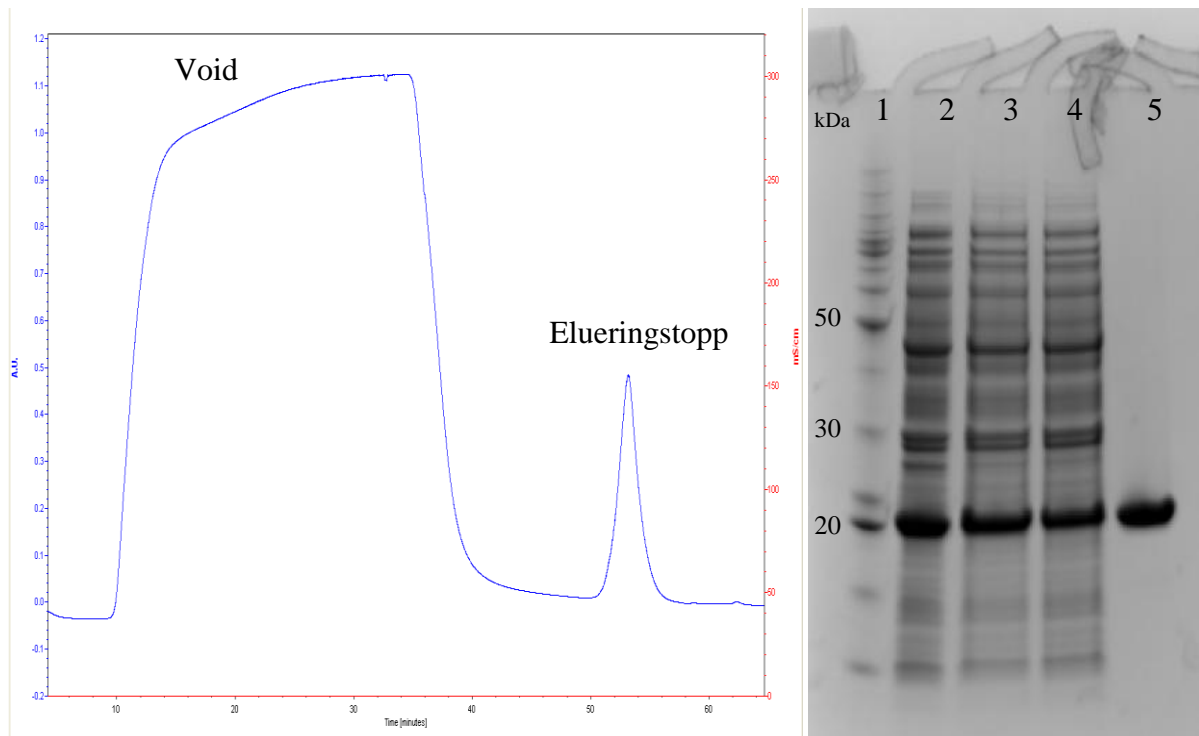


Figur 4.2: Kromatogram (venstre) og SDS-PAGE (høyre) for rensing av ChiB W97A/W220A på kitinkuler. Brønn 1 inneholder ladder, brønn 8 periplasmatisk ekstrakt, brønn 9 void, brønn 10 eluat. Brønn 2 til 7 er fra andre forsøk.



## 4.2.2 CBP21

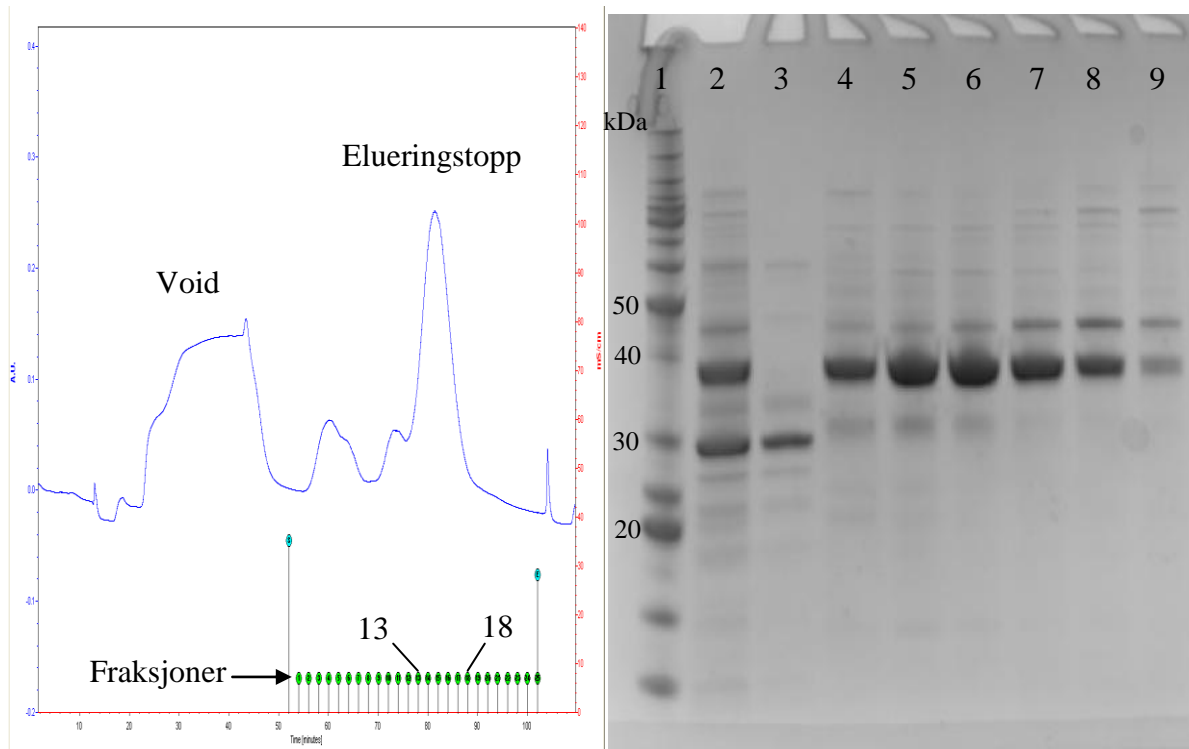
Figur 4.3 viser kromatogrammet og en SDS-PAGE gel etter rensing av CBP21 med affinitetskromatografi. CBP21 har molekylvekt lik 21586 Da.



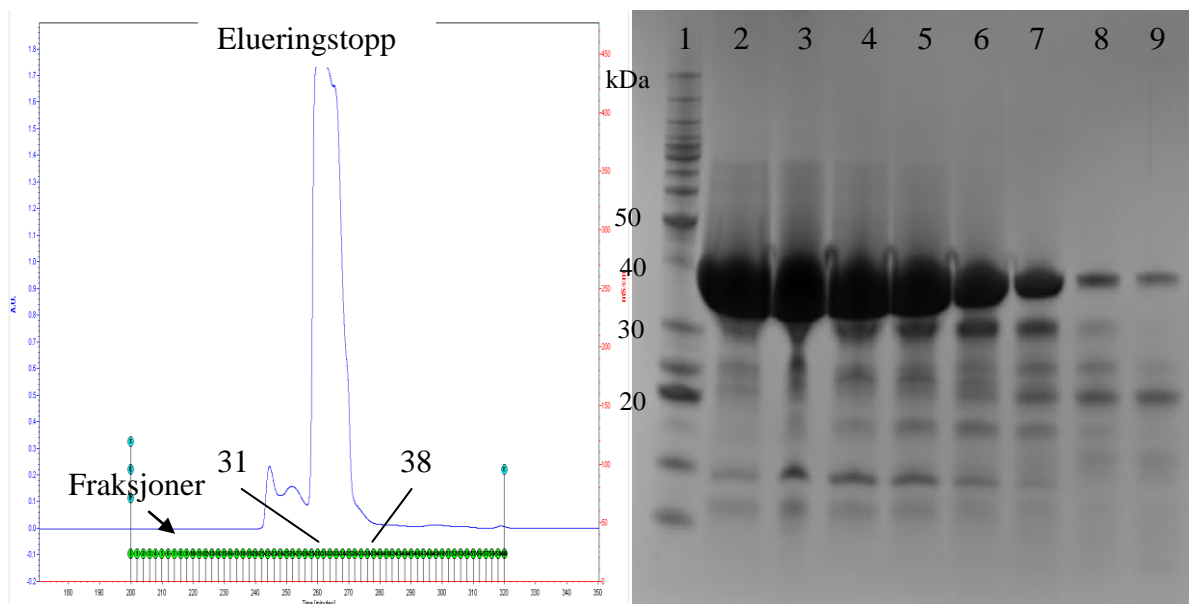
Figur 4.3: Kromatogram (venstre) og SDS-PAGE (høyre) for rensing av CBP21. Elueringstoppen til CBP21 er markert i kromatogrammet. Brønn 1 inneholder ladder, brønn 2 periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 justert periplasmatisk ekstrakt (med TrisHCl +  $(NH_4)_2SO_4$ ), brønn 4 void og brønn 5 eluat.

## 4.2.3 CelS2

CelS2 ble først rensert med en svak anionbytter. Kromatogrammet og en SDS-PAGE gel etter rensing er vist i figur 4.4. Fraksjoner som inneholdt CelS2 ble slått sammen og rensert med størrelseseksklusjonskromatografi. Kromatogrammet og en SDS-PAGE gel etter SEC vist i figur 4.5. CelS2 har molekylvekt lik 38085 Da og SDS-PAGE viser ikke rent protein. CelS2 ble benyttet i pilotstudien av hydrokarbonoksidasjon, og urenhetene ble i første omgang sett vekk fra etter som mengde CelS2 er mye høyere enn forurensingene.



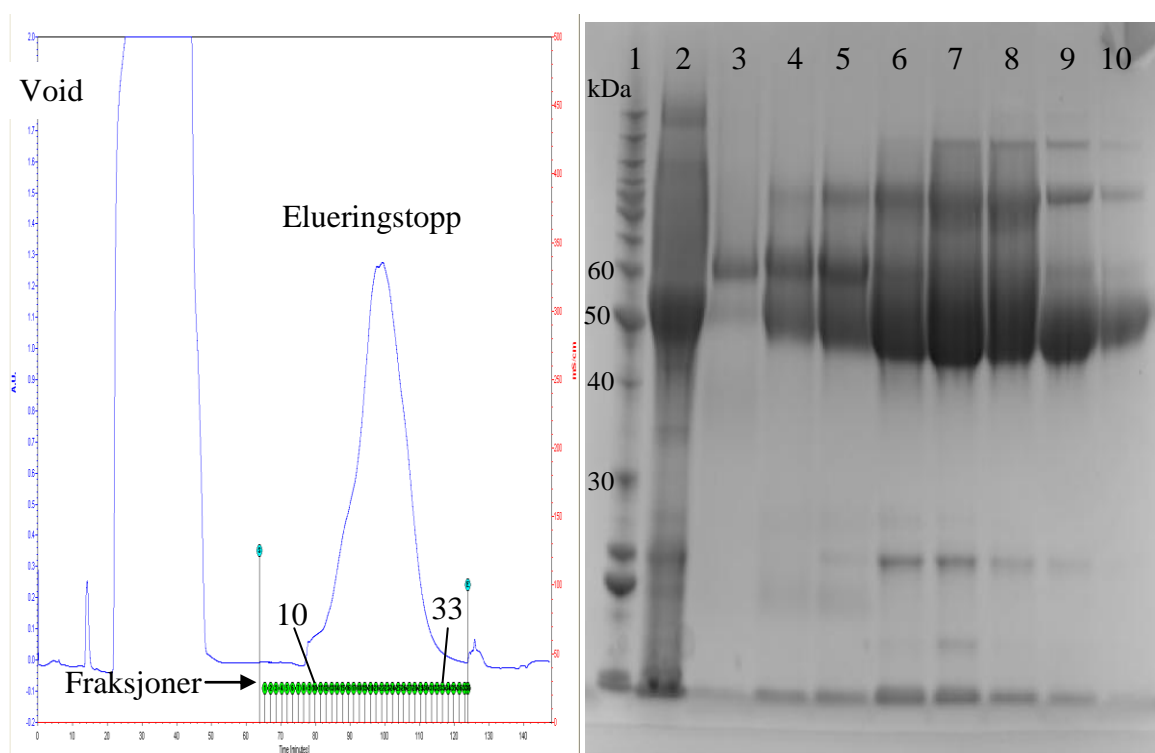
Figur 4.4: Kromatogram (venstre) og SDS-PAGE (høyre) etter rensing av CelS2 med den svake anionbytteren HiTrap DEAE FF. Brønn 1 inneholder ladder, brønn 2 periplasmatisk ekstrakt, brønn 3 void og brønn 4 til 9 fraksjon 13 til 18 fra kromatogrammet. Disse inneholder CelS2.



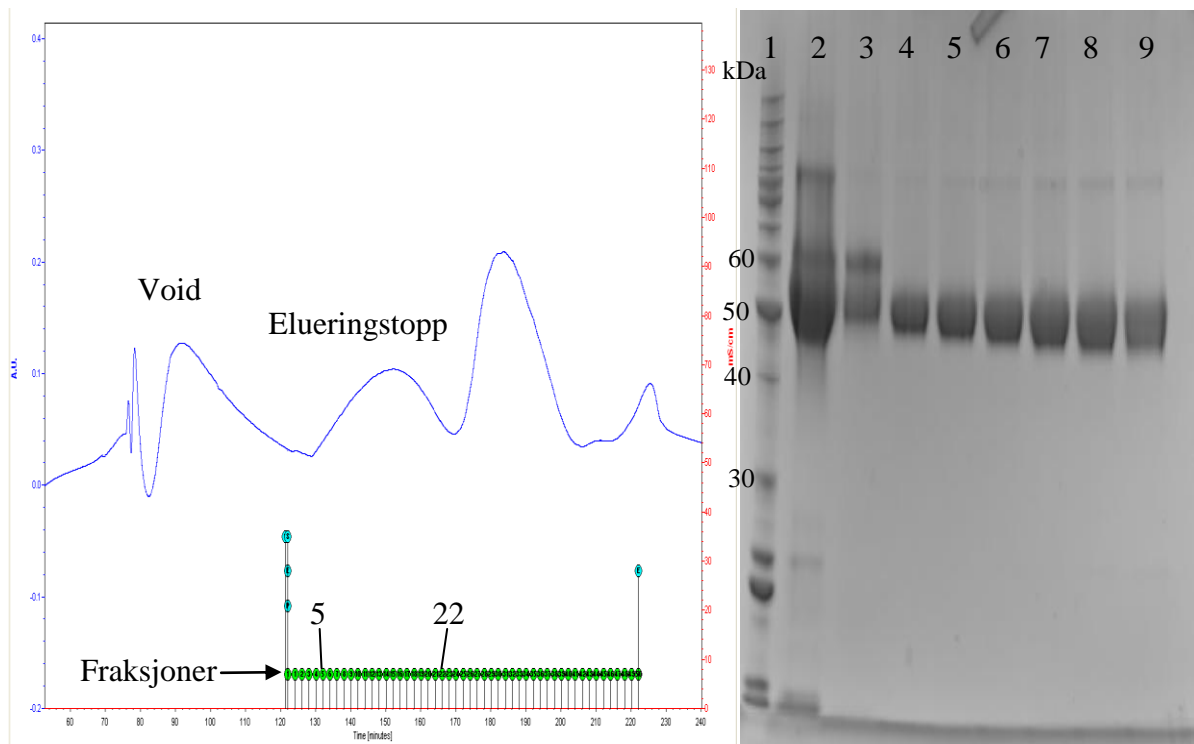
Figur 4.5: Kromatogram (venstre) og SDS-PAGE (høyre) etter rensing av CelS2 med HiLoad 16/600 Superdex 75 pg. Brønn 1 inneholder ladder, brønn 2 til 9 fraksjon 31 til 38 fra kromatogrammet. Disse inneholder CelS2.

## 4.2.4 NcLPMO9C

NcLPMO9C ble først rensset med en sterk kationbytter. Kromatogrammet og en SDS-PAGE gel etter rensing er vist i figur 4.6. Fraksjoner som inneholdt NcLPMO9C ble slått sammen og rensset med hydrofob interaksjonskromatografi. Kromatogrammet og en SDS-PAGE gel etter hydrofob interaksjonskromatografi er vist i figur 4.7. NcLPMO9C har en molekylvekt lik 35755 Da. NcLPMO9C identifiseres med en høyere molekylvekt en forventet med SDS-PAGE på grunn av glykosylering. Etter rensing var det fortsatt noen forurensinger med høyere molekylvekt tilstede. NcLPMO9C ble også benyttet i hydrokarbonoksidasjon studien, og forurensingene ble derfor sett vekk fra ettersom de er svært små sammenlignet med mengden NcLPMO9C.



Figur 4.6: Kromatogram (venstre) og SDS-PAGE (høyre) etter rensing av NcLPMO9C med HiTrap SP HP. Brønn 1 inneholder ladder og brønn 2 void. Brønn 3 fraksjon 10, 11, 12, brønn 4 fraksjon 13, 14, 15, brønn 5 fraksjon 16, 17, 18, brønn 6 fraksjon 19, 20, 21, brønn 7 fraksjon 22, 23, 24, brønn 8 fraksjon 25, 26, 27, brønn 9 fraksjon 28, 29, 30 og brønn 10 fraksjon 31, 32, 33.



Figur 4.7: Kromatogram (venstre) og SDS-PAGE (høyre) etter rensing av NcLPMO9C med HiTrap Phenyl HP. Brønn 1 inneholder ladder, brønn 2 er prøven som ble rensset, brønn 3 void, brønn 4 fraksjon 5, 6, 7, brønn 5 fraksjon 8, 9, 10, brønn 6 fraksjon 11, 12, 13, brønn 7 fraksjon 14, 15, 16, brønn 8 fraksjon 17, 18, 19, brønn 9 fraksjon 20, 21, 22.

### 4.3 Kitin depolymerisering

Depolymerisering av kitin med kitinasene ChiB WT, ChiB W220A, ChiB W97A/W220A, HCHT-39 WT, HCHT-50 WT, HCHT-50 W31A, HCHT-50 W99A og HCHT-50 W218A har blitt utført. Forsøkene ble utført med og uten forbehandling med CBP21. Hastighet for kitinase katalysert hydrolyse ble bestemt i henhold til en to-parameter kinetisk modell som beskrevet i introduksjonen (Kostylev & Wilson 2013). Som tidligere nevnt representerer A-verdien total enzymaktivitet og b-verdien representerer enzymets evne til å overkomme hindringer i det krystallinske substratet.

### 4.3.1 Kitinaser fra *Serratia marcescens*

Mindre krystallinsk substrat, som oppnås med forbehandling av CBP21, øker hastigheten til samtlige ChiB varianter. Økningen er størst for de ikke-prosessive tryptofan til alanin mutantene. Mest oppsiktsvekkende er W220A mutanten som er raskere enn villtype på mindre krystallinske substrater. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> er muligens kosubstratet for LPMO og forsøk med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direkte tilsatt i reaksjonsblandingen ble derfor utført. A og b-verdier etter Kostylev og Wilsons kinetikk modell for forsøk med ChiB utført i dette prosjektet, samt tidligere forsøk utført av Anne-Grethe Strømnes, er vist i tabell 4.1.

Tabell 4.1: Kinetikk parameterene A og b etter Kostylev og Wilsons modell for  $\beta$ -kitin depolymerisering av ChiB WT, ChiB W97A, ChiB W220A og ChiB W97A/W220A med og uten forbehandling av substratet med CBP21. †: [Askorbinsyre]=50  $\mu$ M, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]= 100  $\mu$ M  
\*Forsøk utført av Anne-Grethe Strømnes.

Enzym	A	b
<b>ChiB</b>		
WT*	0.31 $\pm$ 0.04	0.73 $\pm$ 0.10
W97A*	0.05 $\pm$ 0.01	0.96 $\pm$ 0.10
W220A*	0.04 $\pm$ 0.01	1.16 $\pm$ 0.20
W97A/W220A	0.06 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.10
<b>ChiB med CBP21</b>		
WT*	4.16 $\pm$ 0.31	0.45 $\pm$ 0.05
W97A*	2.71 $\pm$ 0.23	0.40 $\pm$ 0.06
W220A*	6.48 $\pm$ 0.74	0.30 $\pm$ 0.08
W97A/W220A	4.43 $\pm$ 0.33	0.23 $\pm$ 0.10
<b>ChiB med CBP21 og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>†</b>		
WT	1.60 $\pm$ 0.48	0.67 $\pm$ 0.17
W220A	0.99 $\pm$ 0.17	0.54 $\pm$ 0.09

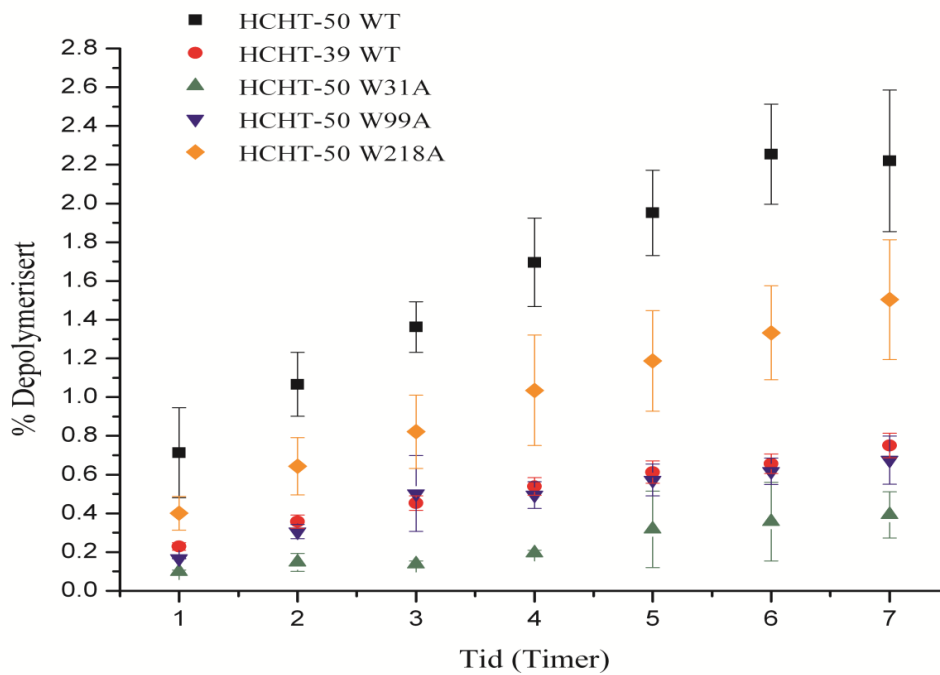
Tidligere forsøk har vist at enzymkinetikk og grad av prosessivitet er avhengig av substratet. Derfor ble forsøk med  $\beta$ -kitin fra Mahtani Chitosan Pvt. Ltd. (0.85 mm) utført. Alle andre forsøk med ChiB og HCHT er utført med  $\beta$ -kitin fra France chitine. Resultatet er vist i tabell 4.2.

*Tabell 4.2: Kinetikk parameterene A og b etter Kostylev og Wilsons modell for  $\beta$ -kitin nedbrytning av ChiB WT og ChiB W220A med og uten forbehandling av substratet med CBP21.  $\beta$ -kitin fra Mahtani Chitosan Pvt. Ltd. (0.85 mm).*

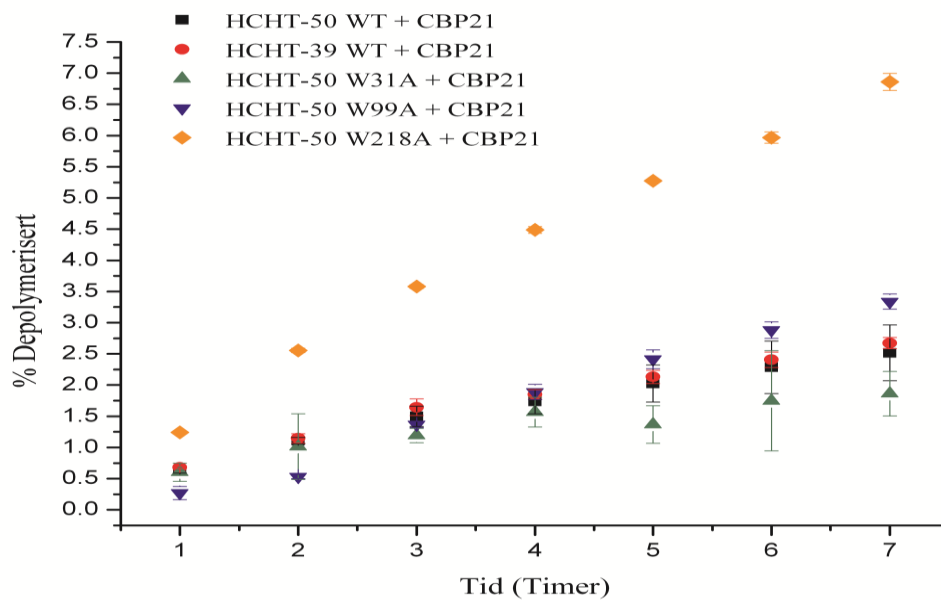
<b>Enzym</b>	<b>A</b>	<b>b</b>
<b>ChiB</b>		
WT	0.23 $\pm$ 0.02	1.05 $\pm$ 0.06
W220A	0.06 $\pm$ 0.01	1.11 $\pm$ 0.06
<b>ChiB med CBP21</b>		
WT	1.39 $\pm$ 0.09	0.79 $\pm$ 0.04
W220A	1.54 $\pm$ 0.22	0.73 $\pm$ 0.09

### 4.3.2 Humane kitinaser

Prosent depolymerisert  $\beta$ -kitin er plottet mot tid og grafer som viser resultater fra henholdsvis forsøk uten og med forbehandling med CBP21 er vist i figur 4.8 og 4.9. Legg merke til at det er benyttet ulik skala på y-aksen. Eksperimentelle A- og b-verdier er vist i tabell 4.3. Økt grad av depolymerisering med karbohydrat bindende domene kan observeres med en sammenlikning av HCHT-39 WT og HCHT-50 WT. Den høye A-verdien til HCHT-50 W218A er også merkverdig.



Figur 4.8: Prosent depolymerisert  $\beta$ -kitin plottet mot tid for HcHT-50 WT, HcHT-39 WT, HcHT-50 W31A, HcHT-50 W99A og HcHT-50 W218A uten forbehandling med CBP21.



Figur 4.9: Prosent depolymerisert  $\beta$ -kitin plottet mot tid for kitinasene HcHT-50 WT, HcHT-39 WT, HcHT-50 W31A, HcHT-50 W99A og HcHT-50 W218A med forbehandling med CBP21.

Tabell 4.3: Kinetikk parameterene *A* og *b* etter Kostylev og Wilsons modell for  $\beta$ -kitin nedbrytning av HCHT villtype og tryptofan-til-alanin mutanter med og uten forbehandling med CBP21.

Enzym	<i>A</i>	<i>b</i>
<b>HCHT-39</b>		
WT	0.24 ± 0.01	0.59 ± 0.04
<b>HCHT-39 med CBP21</b>		
WT	0.74 ± 0.03	0.66 ± 0.03
<b>HCHT-50</b>		
WT	0.72 ± 0.08	0.61 ± 0.07
W31A	0.06 ± 0.03	0.93 ± 0.26
W99A	0.22 ± 0.03	0.60 ± 0.10
W218A	0.49 ± 0.10	0.58 ± 0.12
<b>HCHT-50 med CBP21</b>		
WT	0.70 ± 0.08	0.66 ± 0.07
W31A	0.68 ± 0.14	0.52 ± 0.13
W99A	0.35 ± 0.03	1.18 ± 0.06
W218A	2.22 ± 0.25	0.56 ± 0.06

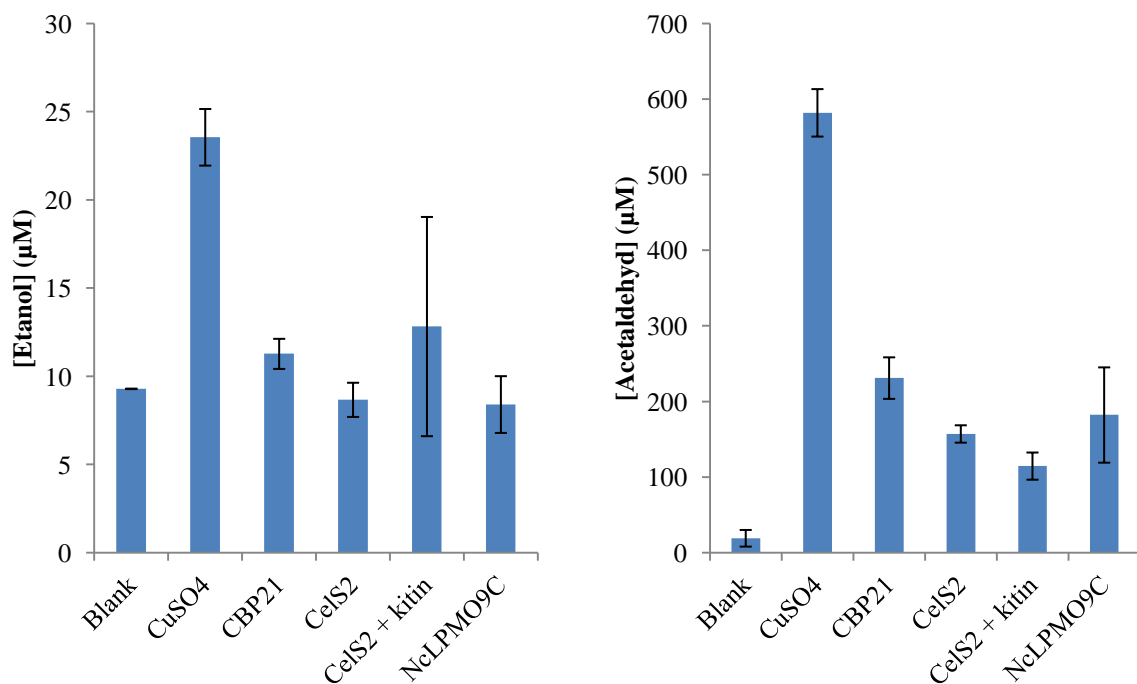


## 4.4 Selektiv hydrokarbonoksidasjon

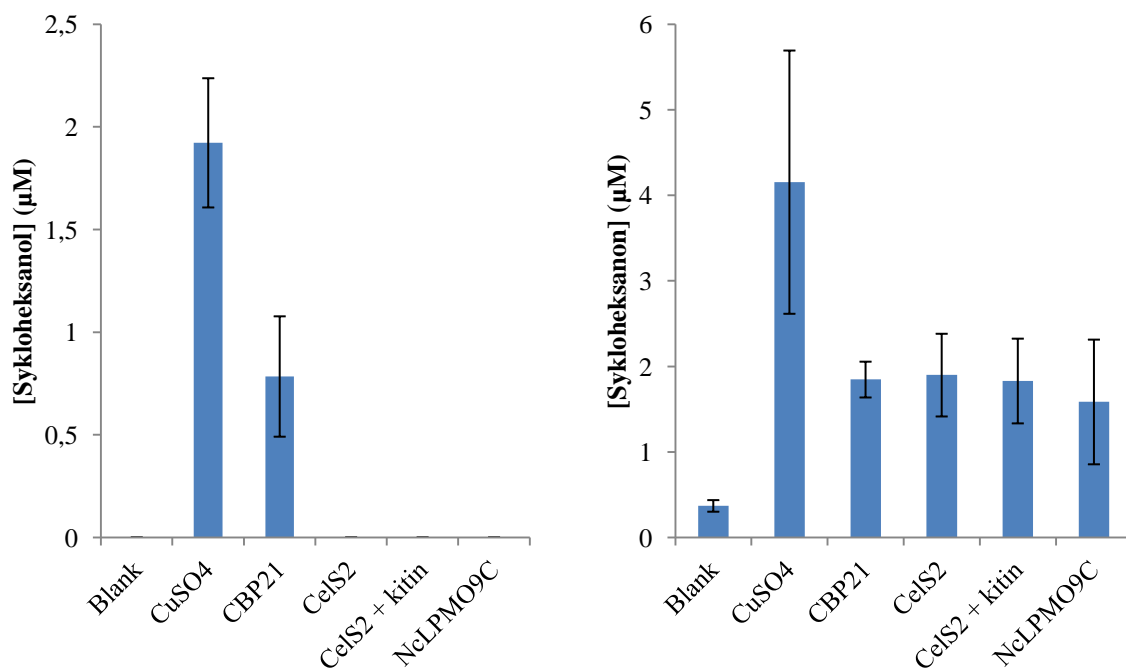
Forsøk med selektiv oksidasjon av hydrokarbonene metan, etan, isobutan, sykloheksan og propen katalysert av LPMOene CBP21, CelS2 og NcLPMO9C har blitt utført. Produktene ble analysert med GC. Det ble benyttet tre forsøksoppsett og resultatene er delt inn i henhold til disse.

### 4.4.1 Forsøksoppsett 1

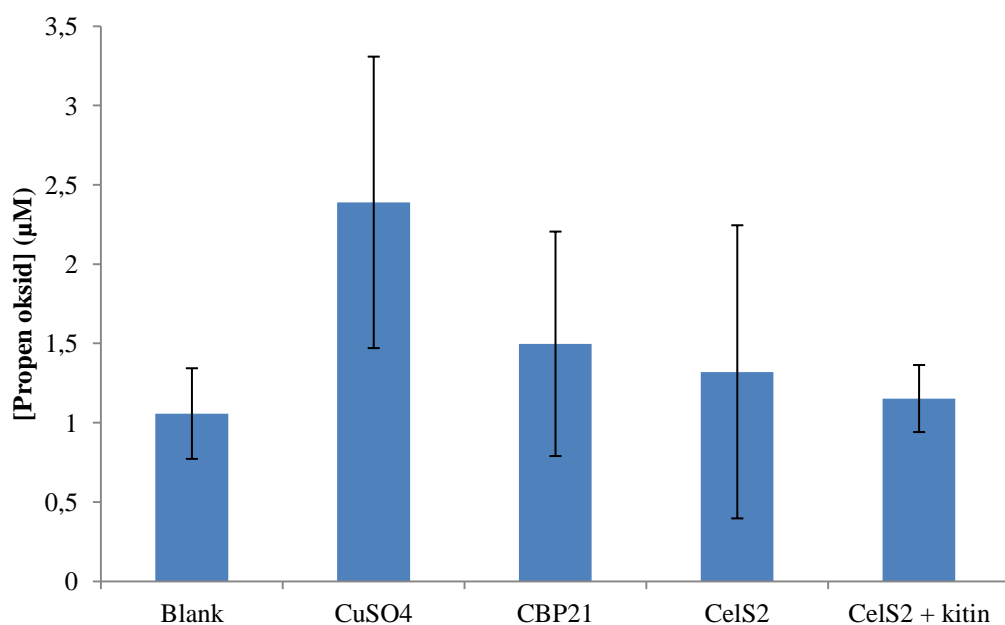
Enzymene ble mettet med kobber i forkant av eksperimentet. Resultater fra forsøk der etan, sykloheksan og propen ble benyttet som substrat er vist i henholdsvis figur 4.10, 4.11, og 4.12. Kvantifisering av sykloheksanol, sykloheksanon og propenoksid ble gjort med eksterne standardkurver. Kvantifisering av etanol og acetaldehyd ble utført via en standardkurve tidligere optimalisert på instrumentet.



Figur 4.10: Hydrokarbonoksidasjon med etan som substrat. Etanol (venstre) og acetaldehyd (høyre) ble detektert som produkter. Reaksjon utført i 50mM natriumfosfatbuffer pH 7.0. [Enzym]=10 $\mu\text{M}$ , [Askorbat]=1mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=1mM, [CuSO<sub>4</sub>]=10 $\mu\text{M}$ , [ $\beta$ -kitin]=1mg/ml.



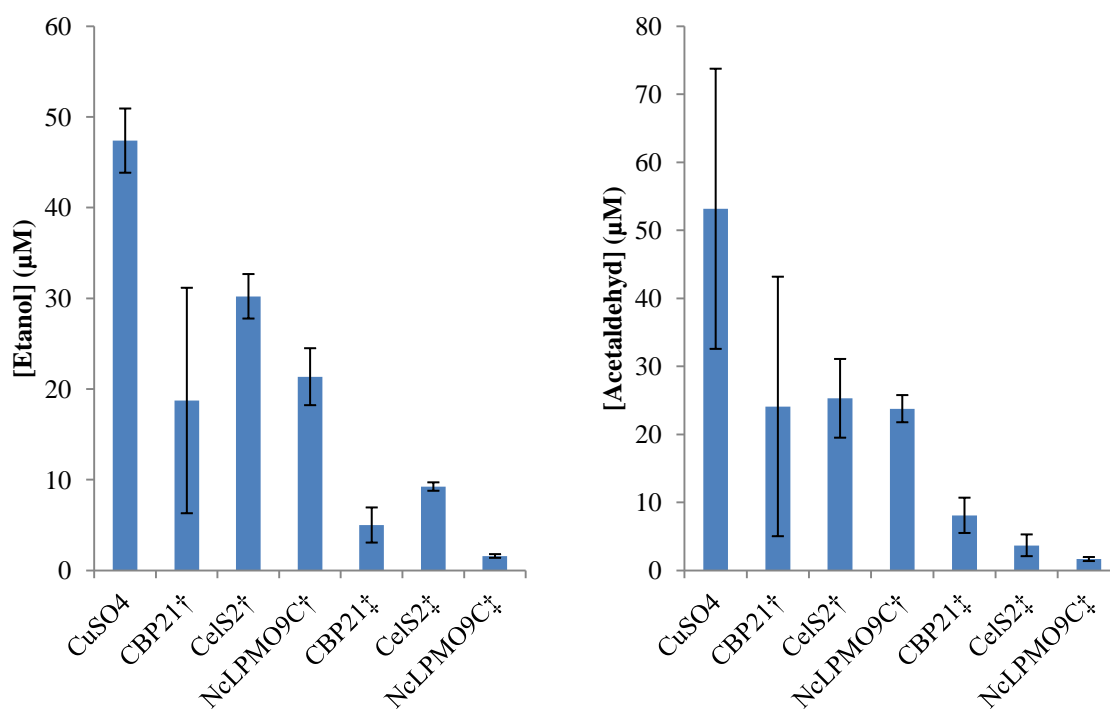
Figur 4.11: Hydrokarbonoksidasjon med sykloheksan som substrat. Sykloheksanol (venstre) og sykloheksanon (høyre) ble detektert som produkter. Reaksjonen ble utført i 50 mM natriumfosfatbuffer pH 7.0. [Sykloheksan] = 10µM, [Enzym] = 10µM, [Askorbat] = 1mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1mM, [CuSO<sub>4</sub>] = 10µM, [β-kitin] = 1mg/ml.



Figur 4.12: Hydrokarbonoksidasjon med propen som substrat. Propenoksid ble detektert som produkt. Reaksjon ble utført i 50mM natriumfosfatbuffer pH 7.0. [Enzym] = 10µM, [Askorbat] = 1mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1mM, [CuSO<sub>4</sub>] = 10µM, [β-kitin] = 1mg/ml.

## 4.4.2 Forsøksoppsett 2

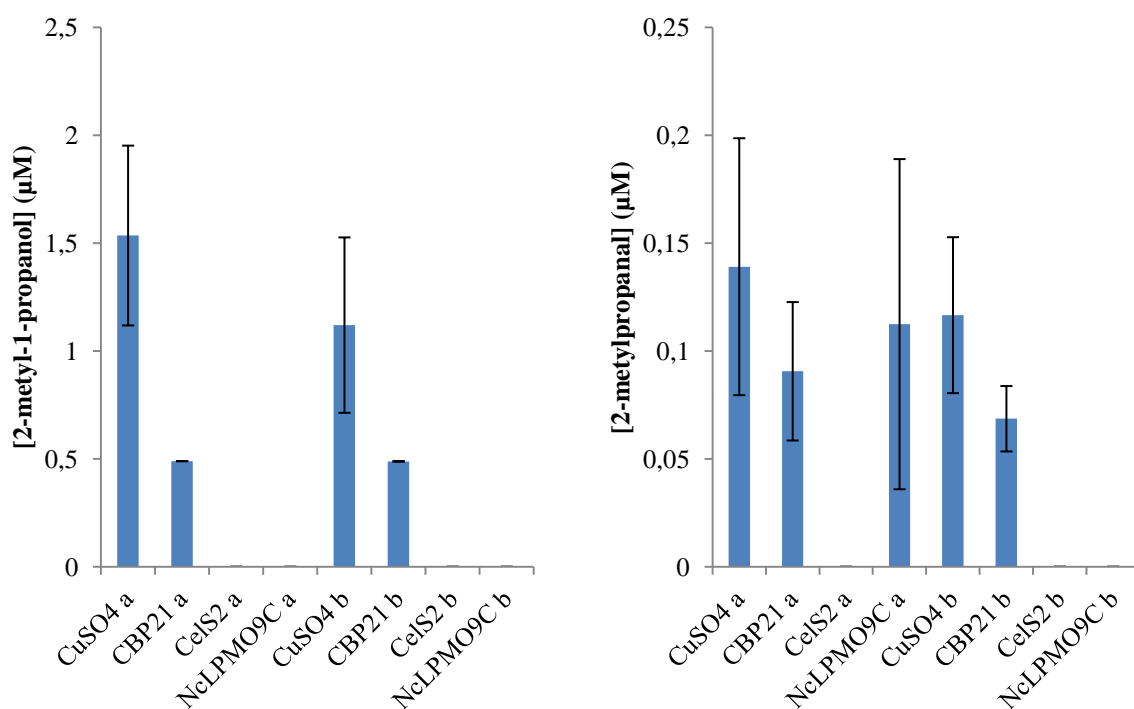
Under forsøksoppsett 2, med etan som substrat, ble det detektert etanol og acetaldehyd som fremstilt i figur 4.13. Kvantifisering av produkter ble utført gjennom en sammenlikning med en ekstern standardkurve som tidligere var kalibrert på instrumentet. Enzymene ble ikke mettet med kobber i forkant av forsøkene og alle prøvene inneholder en  $\text{CuSO}_4$  konsentrasjon på  $20 \mu\text{M}$ .



Figur 4.13: Hydrokarbonoksidasjon med etan som substrat. Etanol (venstre) og acetaldehyd (høyre) ble detektert som produkter. Reaksjonene ble utført i  $50\text{mM}$  natriumfosfatbuffer  $\text{pH}$  7.0.  $[\text{Enzym}] = 5\mu\text{M}$ ,  $[\text{Askorbat}] = 250\mu\text{M}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1\text{mM}$ ,  $[\text{CuSO}_4] = 20\mu\text{M}$ . Alle prøven inneholder  $\text{CuSO}_4$  og LPMOene ble ikke mettet med kobber i forkant av forsøket. †:  $250\mu\text{M}$  Askorbat og  $1\text{mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  tilsatt etter 30 minutter. ‡:  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  tilsatt 5 ganger med 15 minutter intervaller.

### 4.4.3 Forsøksoppsett 3

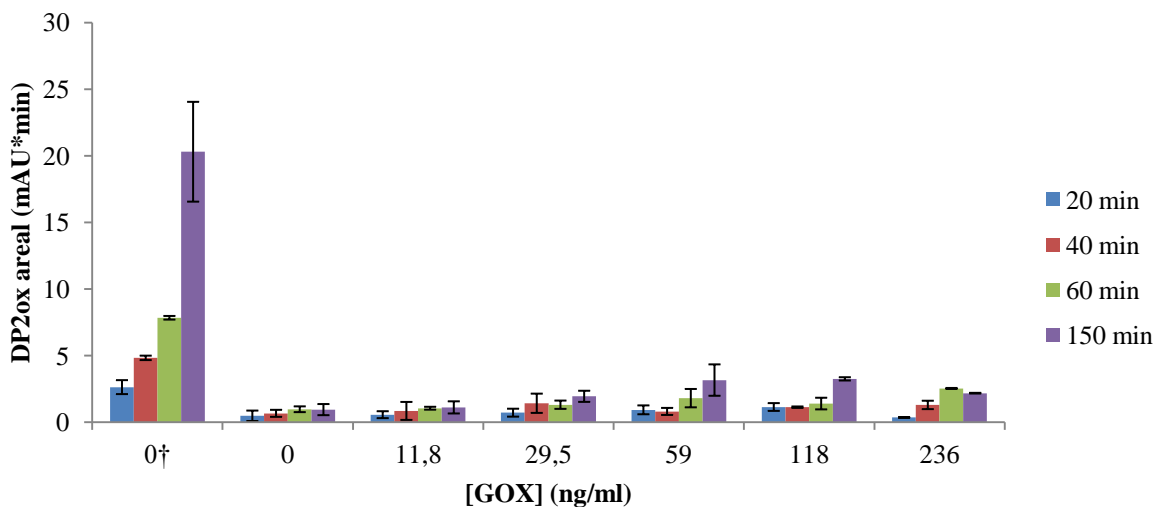
I dette forsøksoppsettet inneholder alle prøver en  $\text{CuSO}_4$  konsentrasjon på  $60 \mu\text{M}$  og LPMOene er ikke mettet med kobber i forkant av forsøket. I GC analysen med isobutan som substrat ble det detektert 2-metyl-1-propanol (isobutanol) og 2-metylpropanal (isobutyraldehyd). Kvantifisering av produkter ble utført gjennom en sammenlikning med en ekstern standardkurve som tidligere var kalibrert på instrumentet. Konsentrasjon av detekterte produkter er vist i figur 4.14.



Figur 4.14: Hydrokarbonoksidasjon med isobutan som substrat. 2-metyl-1-propanol (venstre) og 2-metylpropanal (høyre) detektert som produkter. Reaksjon utført i  $50 \text{ mM}$  natriumfosfat  $\text{pH}$  7.0.  $[\text{CuSO}_4]=60 \mu\text{M}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2]=100\mu\text{M}$ . Alle prøven inneholder  $\text{CuSO}_4$  og LPMOene ble ikke mettet med kobber i forkant av forsøket. a:  $[\text{CBP21}]=11 \mu\text{M}$ ,  $[\text{CelS2}]=6.5 \mu\text{M}$ ,  $[\text{NcLPMO9C}]=11 \mu\text{M}$ ,  $[\text{Askorbat}]=100 \mu\text{M}$ . b:  $[\text{CBP21}]=22 \mu\text{M}$ ,  $[\text{CelS2}]=13 \mu\text{M}$ ,  $[\text{NcLPMO9C}]=22 \mu\text{M}$ ,  $[\text{Askorbat}]=20 \mu\text{M}$ .

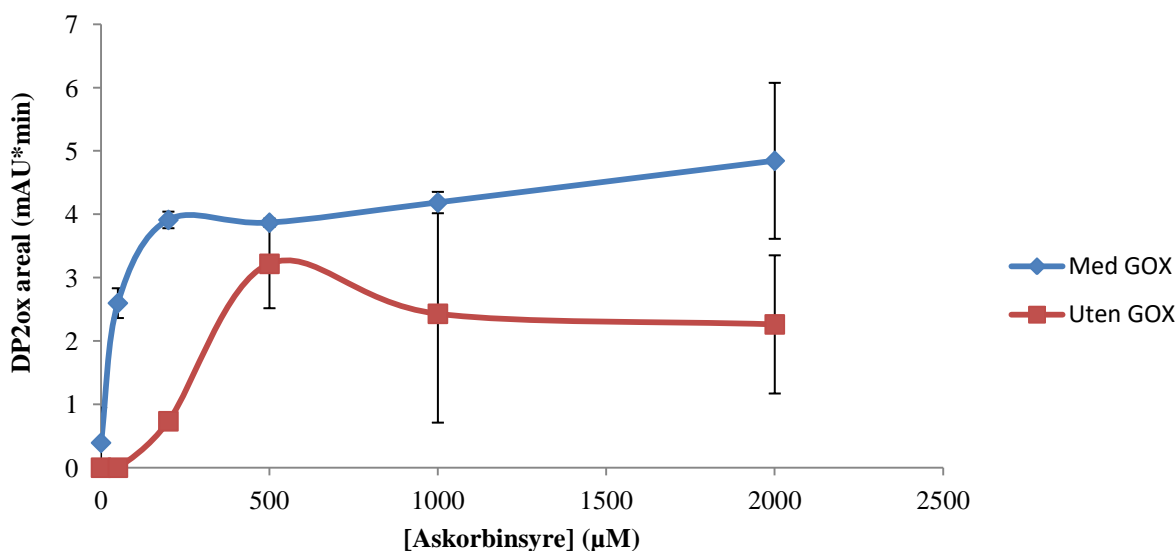
## 4.5 In situ generering av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> med glukoseoksidase

GOX katalyserer oksidasjonen av glukose, med O<sub>2</sub> som kosubstrat, og danner H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og glukono- $\delta$ -lakton som produkter. Basert på tidligere optimalisering av GOX systemet med ScLPMO9C utført av Bastien Bissaro, ble GOX konsentrasjoner på 0, 11.8, 29.5, 59, 118 og 236 ng/ml benyttet i første eksperiment i optimalisering av GOX systemet mot LPMOen CBP21. Reaksjonen ble utført med 50  $\mu$ M askorbinsyre, med unntak av en kontroll med 2 mM askorbinsyre. Resultatet er vist i figur 4.15.



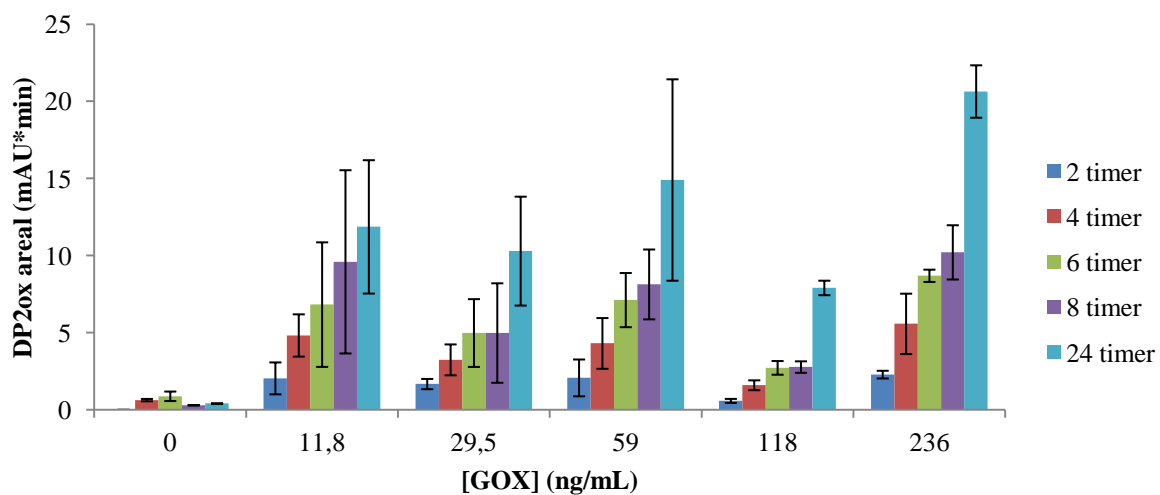
Figur 4.15: Areal av oksidert *N,N*-diacetylkitobiose (DP2ox) som funksjon av ulike konsentrasjoner av GOX og ulike reaksjonstider. Reaksjonene ble utført i 50 mM natriumacetatbuffer pH 6.10. [CBP21] = 1 $\mu$ M, [ $\beta$ -kitin] = 20 mg/ml, [Askorbinsyre] = 50  $\mu$ M, [glukose] = 15mM. Totalvolumet var 500  $\mu$ l. Prøver ble tatt ut etter 20, 40, 60 og 150 minutter. †=2 mM Askorbinsyre.

Basert på resultatene i figur 4.15 ble en GOX-konsentrasjon på 118 ng/ml valgt for å bruke i den videre optimaliseringen. I det neste steget ble GOX-konsentrasjonen holdt konstant på 118 ng/ml, mens askorbinsyrekonsentrasjonen ble variert. Konsentrasjonene som ble valgt var 0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM og 2 mM. For hver askorbinsyrekonsentrasjon ble det utført forsøk med og uten GOX. Det ble tatt ut prøver etter 20, 60, 100 og 150 minutter. Figur 4.16 viser resultatet etter 60 minutter.



Figur 4.16: Areal av oksidert *N,N*-diacetylkitobiose (DP2ox) plottet mot ulike konsentrasjoner av askorbinsyre (0 µM, 50 µM, 200 µM, 500 µM, 1 mM og 2 mM) etter 60 minutters reaksjon. Reaksjonene ble utført i 50 mM natriumacetatbuffer pH 6.10. [CBP21] = 1µM, [β-kitin] = 20 mg/ml, [glukose] = 15 mM, [GOX] = 118 ng/ml eller 0 ng/ml. Totalvolumet var 500 µl.

Ved askorbinsyrekonsentrasjon lik 200 µM var det størst forskjell i produktdannelse mellom forsøk utført med og uten GOX. Optimalisering er en iterativ prosess, og i det neste steget ble derfor askorbinsyrekonsentrasjonen holdt konstant ved 200 µM, mens GOX konsentrasjonen ble variert med samme konsentrasjoner som i det første forsøket (figur 4.15). Reaksjonen ble utført i 50 mM Bis-Tris buffer pH 6.10, i motsetning til de to foregående GOX-forsøkene som ble utført i 50 mM natriumacetatbuffer pH 6.10.



Figur 4.16: Areal av oksidert  $N,N'$ -diacetylkitobiose (DP2ox) som funksjon av ulike konsentrasjoner av GOX og ulike reaksjonstider. Reaksjonene ble utført i Bis-Tris buffer pH 6.10. [CBP21] =  $1\mu\text{M}$ , [ $\beta$ -kitin] = 20 mg/ml, [Askorbinsyre] = 200  $\mu\text{M}$ , [glukose] = 15 mM. Totalvolum var 500  $\mu\text{l}$ . Prøve ble tatt ut etter 2, 4, 6, 8 og 24 timer.

## 5 Diskusjon

### 5.1 Kitin depolymerisering

#### 5.1.1 Hastighetsøkende effekt av CBP21, ChiB

Horn et al. har studert hvilke residuer som er viktige for prosessivitet i ChiB. Det ble vist ved tryptofan til alanin mutanter at aromatiske aminosyrer i det aktive setet, W97 i subsete +1 og W220 i subsete +2, er viktige for grad av prosessivitet, hastighet og grad av depolymerisering. Et annet interessant funn var at disse mutantene gjorde enzymet raskere mot det løselige kitin derivatet kitosan. Disse funnene indikerer fordeler og ulemper ved prosessivitet. En fordel med prosessivitet er evnen til å depolymerisere krystallinsk kitin, mens en ulempe er at residuer viktige for prosessivitet gir enzymene en iboende treghet. Prosessivitet går på bekostning av effektivitet. Horn et al. postulerte at ved å gjøre kitin mindre krystallinsk var prosessivitet en unødvendig og uønskelig egenskap (Horn et al. 2006). I dette arbeidet blir prosessivitet forbigått ved mutasjon av tryptofan til alanin i det aktive sete, og kitin gjøres mindre krystallinsk med forbehandling med LPMOen CBP21.

Resultatene viser at mindre krystallinsk substrat gir høyere A- verdier for alle ChiB variantene. Økningen er størst for tryptofan til alanin mutantene sammenlignet med villtypen. For ChiB WT, ChiB W97A, ChiB W220A og ChiB W97A/W220A er økningen med CBP21 kontra uten CBP21 henholdsvis 13 ganger, 54 ganger, 162 ganger og 74 ganger. Dette underbygger den allerede etablerte teorien om CBP21 sine egenskaper til å øke nedbrytning av kitin i synergi med kitinaser.

Mutanten W220A er raskere enn villtype med forbehandling av substratet med CBP21. Dette gir støtte til hypotesen om at prosessivitet ikke er fordelaktig i depolymerisering av mindre krystallinske substrater. Forsøk med ChiB W97A/W220A utført i dette prosjektet har en A-verdi som er nærliggende ChiB WT med forbehandling av CBP21. Med CBP21 har ChiB W220A en A-verdi som er 1.5 ganger høyere enn ChiB WT, mens W97A har en A- verdi som er 1.5 ganger lavere enn ChiB WT. Det kan tenkes at dobbeltmutanten ChiB W97A/W220A har egenskaper av begge residuer og får en A-verdi deretter.



Tidligere forsøk, samt alle andre forsøk utført i dette prosjektet, har blitt utført med  $\beta$ -kitin fra France Chitine (180  $\mu$ M).  $\beta$ -kitin er et substrat som kan variere mye fra ulike batcher og ulike produsenter. Uten forbehandling med CBP21 gir begge typene  $\beta$ -kitin tilnærmet samme resultatet for ChiB WT og ChiB W220A. Med  $\beta$ -kitinet fra Mahtani Chitosan Pvt. Ltd og med forbehandling av CBP21 observeres ikke signifikante forskjeller mellom ChiB WT og ChiB W220A, slik det ble observert med  $\beta$ -kitin fra France Chitine i tidligere eksperimenter (Strømnes 2016). Standardavviket for ChiB W220A med  $\beta$ -kitin fra Mahtani Chitosan Pvt. Ltd er stort og kontrollforsøk bør utføres. A-verdiene observert med Mahtani Chitosan Pvt. Ltd kitinet er også lavere sammenlignet med kitinet fra France Chitine noe som tyder på mer krystallinitet og vanskeligere nedbrytbart kitin fra Mahtani Chitosan Pvt. Ltd. Tallene 0.85 mm og 180  $\mu$ m angir øvre grense av partikkelstørrelse. Dette er en liten forskjell i partikkelstørrelse og den observerte forskjellen i A-verdi mellom kitinprodusentene kan ikke kun forklares på grunnlag av partikkelstørrelse.

Hydrogenperoksid, som er et postulert kosubstrat for LPMO, ble direkte tilsatt i reaksjonsblandingen. Under forsøk med  $H_2O_2$  tilsatt i reaksjonsblandingen med ChiB WT og ChiB W220A ble det ikke observert signifikant forskjell i A-verdi mellom enzymene. Sammenlignet med A-verdier (France chitine) uten tilsatt  $H_2O_2$ , har reaksjonen med  $H_2O_2$  en A-verdi 3 ganger lavere for WT og 7 ganger lavere for W220A. Dette kan skyldes at enzymet oksideres og inaktiveres av  $H_2O_2$ . En annen grunn til lavere aktivitet kan skyldes at reaksjonsbetingelsene med  $H_2O_2$  inneholder 40 ganger mindre askorbinsyre. Sammenlignet med reaksjon uten CBP21, er A-verdiene med CBP21 og  $H_2O_2$  5 ganger høyere for WT og 25 ganger høyere for W220A.

### **5.1.2 Hastighetsøkende effekt av CBP21, HCHT**

Det er postulert at HCHT alene er et kitinolytisk maskineri (Stockinger et al. 2015). Normalt består et kitinolytisk maskineri av to ekso-prosessive GHer som er aktive fra reduserende og ikke-reduserende ende av polymeren, samt en ikke-prosessiv GH som er endoaktiv. For effektiv kitin depolymerisering må HCHT inneha alle disse egenskapene. HCHT har vist seg å være en endoprosessiv kitinase som hydrolyserer mot den ikke-reduserende enden (Eide et al. 2016; Kuusk et al. 2017; Stockinger et al. 2015). HCHT er mindre prosessiv enn både ChiA og ChiB fra *Serratia marcescens*. Interessante observasjoner er at HCHT-50 WT og HCHT-39 WT er ~10 ganger raskere mot det løselige substratet kitosan enn ChiA og ChiB. Ved mutasjon av aromatisk residuer i det aktive setet til HCHT reduseres hastigheten for

kitosan depolymerisering ~20 ganger, mens den øker ~20 ganger for ChiA og ChiB (Horn et al. 2006; Stockinger et al. 2015). Med bakgrunn i disse funnene, samt at mennesker ikke har noen LPMO analog, ble effekten av CBP21 i kitindepolymerisering med HCHT undersøkt for begge isoformer og mutanter hvor aromatiske residuer i det aktive sete er mutert til alanin.

Forbehandling av  $\beta$ -kitin med CBP21 gir økt A-verdi for samtlige HCHT varianter. Dette i motsetning til tidligere resultater hvor tryptofan til alanin mutanter av HCHT har vist lavere aktivitet mot mindre krystallinske substrater (kitosan). Et unntak er forsøk med HCHT-50 WT hvor A-verdien er lik med og uten CBP21. Økningen i A-verdi med CBP21 kontra uten CBP21 er 3 ganger for HCHT-39 WT, 11 ganger for HCHT-50 W31A og 5 ganger for HCHT-50 W218A. Den største relative økningen observeres for HCHT-50 W31A (11 ganger). HCHT-50 W31A har den laveste A- verdien uten CBP21, hvilket antyder at CBP21 har større effekt på mutanter med lave A-verdier.

Isoformen HCHT-39 WT, uten karbohydrat bindende domene, har en 3 ganger lavere A-verdi enn HCHT-50 WT uten forbehandling med CBP21. Sammenligning av resultatene med forbehandling av CBP21 lar seg vanskelig gjøre da det stilles spørsmålstegn med resultatet for HCHT-50 WT. Resultatet uten CBP21 tyder på at karbohydrat-bindene domene har en økende effekt på effektivitet av depolymeriseringen av  $\beta$ -kitin. Karbohydrat bindene domene binder til karbohydrater og orienterer enzymets aktive sete i korrekt posisjon til å inngå i katalyse noe som forklarer økningen i A- verdi.

### 5.1.3 Sammenligning av ChiB og HCHT

Effekten av forbehandling av substratet med CBP21 er høyere for ChiB, som er ko-evolvert med LPMOen, enn for HCHT, som naturlig depolymeriserer kitin uten hjelp av LPMO. Hamre et. al har utført forsøk hvor effekten av CBP21 på depolymeriseringen av  $\beta$ -kitin har blitt undersøkt (Hamre et al. 2015). Det ble utført forsøk med de ekso prosessive kitinasene ChiA og ChiB, samt den endo ikke-prosessive kitinasen ChiC. Kinetikk parameteren  $k_{cat}^{app}$  ble bestemt for ChiA, ChiB og ChiC med og uten forbehandling av substratet med CBP21. For ChiA og ChiB ble det observert en økning i  $k_{cat}^{app}$  med CBP21, mens CBP21 hadde ingen effekt på  $k_{cat}^{app}$  for ChiC. På lik linje med ChiC er HCHT også en endoaktiv kitinase. Dette tyder på at forbehandling med CBP21 har større effekt på eksoaktive kitinaser enn endoaktive kitinaser.  $k_{cat}^{app}$  er bestemt med en reaksjonstid på 16 minutter, mens A-verdier er bestemt med en reaksjonstid på 7 timer og er ikke direkte sammenlignbare. I motsetning til ChiC er

HCHT prosessiv. Resultater etter kostylev og wilsons modell utført i dette prosjektet viser en effekt av forbehandling med CBP21 i forsøk med HCHT.

Uten forbehandling av substratet med CBP21 viser ChiB mutantene W220A (subsete +2) og W97A (subsete +1) svært lav aktivitet, mens analoge mutanter av HCHT50, W218A (subsete +2) og W99A (subsete +1) viser relativt høy aktivitet. Aromatiske residuer nær det aktive sete er viktige for prosessivitet til enzymer. Resultatet tyder på at ChiB er mer avhengig av prosessivitet for depolymerisering av  $\beta$ -kitin enn HCHT. Tryptofan til alanin mutanter nær det aktive setet og substrat som ikke er forbehandlet med CBP21 kan oversettes til lite prosessive kitinaser og krystallinsk substrat. Høyere A-verdi for HCHT enn ChiB kan forklares med at HCHT er en endo kitinase, mens ChiB er en ekso kintinase. ChiB kan bare angripe endene som er få i et krystallinsk substrat, mens HCHT angriper internt i krystallen og har dermed mer tilgjengelig substrat.

Et annet merkelig resultat, som underbygger teorien om at prosessivitet kan gå på bekostning av effektivitet, er A-verdiene for tryptofan til alanin mutanten i subsete +2 (ChiB W220A og HCHT W218A). Effekten er tydeligst for ChiB W220A hvor mutanten er mer effektiv enn ChiB WT med forbehandling av substratet CBP21. Å trekke denne konklusjonen for HCHT50 W218A er noe mer usikker, mest på grunn av A- verdien for HCHT50 WT som tidligere nevnt ikke passer inn i forklaringsmodellen med en nesten samme A-verdien med og uten forbehandling med CBP21. HCHT W218A viser høy grad av effektivitet i depolymerisering av mindre krystallinsk substrat (høyere enn villtypen selv om resultatet er usikkert).

b-verdien er et mål på enzymets evne til å overkomme hindringer i det krystallinske substratet. I Kostylev og Wilsons forsøk med cellulaser i synergi med LPMO ble det observert en økning i b- verdi sammenlignet med reaksjon uten LPMO (Kostylev & Wilson 2013). Trenden for ChiB er motsatt da b- verdien er lavere for reaksjoner med CBP21. Resultatene for HCHT viser ingen klar trend i b-verdi og observerte resultater er vanskelig og tolke.

## 5.2 Selektiv hydrokarbonoksidasjon

Resultatene viser en gjennomgående trend at prøver som inneholder  $\text{CuSO}_4$ , og ikke inneholder LPMO, danner mest oksiderte produkter. En annen trend er at askorbat konsentrasjonen er viktig for dannelsen av oksiderte produkter. Høyere askorbat konsentrasjon gir høyere konsentrasjon av oksiderte produkter. En sammenlikning av de ulike LPMOene viser ingen signifikant forskjell i produktdannelse under alle tre forsøksoppsett. Av de ulike substratene forsøkt ble det observert mest oksiderte produkter med etan.

Fenton kjemi er en mulig forklaringsmodell for de observerte resultatene. Fenton kjemi innebærer dannelse av hydroksylradikaler ( $\text{HO}^\bullet$  og  $\text{HOO}^\bullet$ ) fra  $\text{H}_2\text{O}_2$  katalysert av reduserte transisjonsmetaller som for eksempel enverdig kobber ( $\text{Cu}^+$ ). Hydroksylradikaler er svært reaktive og kraftige oksidanter.

Under forsøksoppsett 2 og 3 er alle prøver tilsatt  $\text{CuSO}_4$  og LPMOene er ikke mettet med kobber før forsøket. Observasjonen av lavere konsentrasjon av oksiderte produkter i prøver som inneholder LPMOer, kan forklares ved at LPMOer binder kobber og hindrer kobber fra å inngå i katalyse. Det kan tenkes at fritt kobber er en bedre katalysator enn kobber bundet av et enzym.

Mest oppsiktsvekkende er resultatet under forsøksoppsett 1 hvor blankprøve har lavere konsentrasjon av oksiderte produkter enn prøver som inneholder LPMO mettet med kobber, som igjen har lavere konsentrasjon av oksiderte produkter enn prøven med  $\text{CuSO}_4$  hvor konsentrasjonen av LPMO og  $\text{CuSO}_4$  var den samme ( $10\mu\text{M}$ ). Dette indikerer at kobber er viktig for dannelsen av oksiderte produkter og underbygger resultatene fra forsøksoppsett 2 og 3 at fritt kobber er en bedre katalysator enn enzytbundet kobber.

Garcia-Bosch et al. rapporterer om oksidasjon av alkaner med  $\text{H}_2\text{O}_2$  katalysert av kobberkomplekser med en foreslått fenton kjemi mekanisme og alkyl hydroperoksider har blitt observert. I forsøk med sykloheksan som reaktant varierte utbytte og selektivitet for sykloheksanol eller sykloheksanon mye med hensyn på ligander i kobberkomplekset (Garcia-Bosch & Siegler 2016).

Under forsøksoppsett 2, med etan som substrat, ble det detektert etanol og acetaldehyd som produkter uten noen stor overvekt av en av produktene. Prøver som tilsettes 250  $\mu\text{M}$  askorbat og 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  etter 30 minutter gir mer produkt enn tilsats av 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  fem ganger med 15 minutters intervaller. Tilsats av askorbat, som reduserer kobber og aktiverer LPMOer, og fire ganger mer  $\text{H}_2\text{O}_2$ , som er en kraftig oksidant, kan forklare den økte deteksjonen av oksiderte produkter. Etan ble også benyttet som substrat under forsøksoppsett 1. Dette resulterte i stor overvekt av acetaldehyd i forhold til etanol. Acetaldehyd konsentrasjonen var 20 ganger høyere enn etanol konsentrasjonen, med unntak av blankprøven hvor acetaldehyd konsentrasjonen var 2 ganger konsentrasjonen av etanol. Forsøksoppsett 2a danner 2 ganger høyere konsentrasjon av etanol sammenlignet med forsøksoppsett 1. Når det gjelder acetaldehyd observeres det 9 ganger høyere konsentrasjon under forsøksoppsett 1 sammenligning med forsøksoppsett 2. Dette tyder på at forsøksoppsett 1 er sterkere oksidative betingelser enn forsøksoppsett 2 da acetaldehyd er oksidasjonstrinnet videre fra etanol.

Regresjonslinjene til standardkurvene for sykloheksanol, sykloheksanon og propen oksid hadde høye  $R^2$ -verdier (henholdsvis 0.9983, 0.9981 og 0.998) og ble tvunget gjennom origo. Kalkulerte konsentrasjoner av sykloheksanol, sykloheksanon og propen oksid ligger under laveste konsentrasjon for standardkurven og er følgende usikre, men et estimat i hvilket konsentrasjonsområde produktene befinner seg. Selv om konsentrasjonene er usikre kan fortsatt resultatene benyttes i sammenligning innad for hvert oksiderte produkt som detekteres.

Under forsøksoppsett 1 detekteres det dobbelt så mye av ketonet sykloheksanon enn alkoholen sykloheksanol. Dette er i motsatt av hva som ble observert for isobutan med overvekt av alkoholen. Med propen som substrat detekteres propenoksid. Standardavvikene for propenoksid er store og overlappende, og resultatene er følgende usikre.

Det ble også utført forsøk med 1 mg/ml  $\beta$ -kitin i reaksjonsblandningen med CelS2. Ideen er at kitin binder til CelS2 og har beskyttende egenskaper ovenfor oksidativ skade på enzymet. Det ble ikke detektert signifikant forskjell mellom prøver innholdene CelS2 og CelS2 med  $\beta$ -kitin.

Under forsøksoppsett 3 ble det detektert 10 ganger høyere konsentrasjoner av 2-metyl-1-propanol enn 2-metylpropanal med isobutan som substrat. Aldehydet 2-metylpropanal er et oksidasjonstrinn videre fra alkoholen 2-metyl-1-propanol, overvekt av alkoholen kan tyde på

at denne formen er stabil eller at dette er milde oksidative reaksjonsbetingelser. Det er merkverdig at 2-metyl-1-propanol detekteres som produkt og ikke 2-metyl-2-propanol. C-H bindingen til det sentrale karbonatomet i isobutan er svakere enn C-H bindingene i metylgruppene da tertiære radikale kationer stabiliseres av metylgruppene, noe som favoriserer dannelse av den tertiære alkoholen.

Under forsøksoppsett 3 med metan som substrat ble ingen topp i kromatogrammet annotert metanol, men ved retensjonstid 1.38 minutter ble det detektert en stor topp. Dette er en kort retensjonstid og det kan tenkes at det er en blanding av oksiderte produkter av metan som metanol og formaldehyd som begge er flyktige og vil ha kort retensjonstid i kolonnen. Basert på observerte resultater hvor alle substrater danner oksiderte produkter, er det sannsynlig at dette er oksiderte produkter av metan.

### **5.3 In situ generering av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> med glukoseoksidase**

I det første optimaliseringstrinnet viste kontrollen med 2 mM askorbinsyre størst dannelse av produkter oksidert N,N'-diacetylkitobiose (DP2ox), da askorbinsyre er en kjent aktivator for LPMOer. Reaksjonene med økende GOX konsentrasjon viser ustabil kinetikk, særlig ved korte reaksjonstider. Resultatene viser ingen klar økning i DP2ox med økende konsentrasjon av GOX.

Andre optimaliseringstrinn, hvor askorbinsyre konsentrasjonen varieres og GOX holdes konstant, ble også tatt ut prøver ved 20, 60, 100 og 150 minutter reaksjonstid. Alle reaksjonstidene følger den samme trenden. Trenden er at reaksjon med GOX har større mengde produkt enn reaksjoner uten GOX. Produkt konsentrasjonen øker også over tid, og reaksjonstid 150 minutter har høyest konsentrasjon av produkt. En annen trend er at forskjellen i produktdannelse, med og uten GOX, er størst og mest signifikant forskjell ved lave konsentrasjoner av askorbinsyre. Etter 500 µM askorbinsyre, flater kurven ut, og effekten av en økning i askorbinsyre konsentrasjon er ikke like stor.

I det tredje optimaliseringstrinnet med konstant askorbinsyre konsentrasjon og varierende GOX konsentrasjon, observeres økende produktdannelse helt til 24 timer og enzym inaktivering er ikke et problem. GOX i reaksjonsblandingen danner mer DP2ox sammenlignet med kontrollreaksjonen uten GOX. Som under første optimaliseringstrinn viser resultatene for

det tredje optimaliseringstrinnet ingen klar økning i DP<sub>2ox</sub> med økende konsentrasjon av GOX.

Grunnet tid og mangelfulle resultater for GOX optimaliseringen, ble dessverre ikke GOX systemet benyttet i LPMO aktivering mot kitin depolymerisering eller hydrokarbonoksidasjon.

## 6 Veien videre

Andre aromater til alanin mutanter nærheten av det aktive setet bør også studeres for mer utfyllende kunnskap om kitinaser og kitin depolymerisering. I dette prosjektet ble det startet forsøk med ChiB F190A og ChiA F396A, men tiden strakk dessverre ikke til. Dobbelmutanten ChiB F190A/ W220A, som ble forsøkt tillaget med seterettet mutagenese i dette prosjektet, kan være neste steg i prosessen. Som nevnt i diskusjonen bør forsøk med HCHT-50 WT med forbehandling av CBP21 gjentas.

Under GC resultatene med sykloheksan som substrat ble det observert en stor topp ved retensjonstid 5.46 minutter som ikke ble identifisert. En stor uidentifisert topp observeres også i propen resultatene ved retensjonstid 1.56 minutter. En identifikasjon av disse toppene med GC/MS vil være av interesse. Annet videre arbeid kan innebære øke LPMOers affinitet for hydrokarboner. Dette kan oppnås ved å gjøre området rundt det aktive sete mer hydrofobt med seterettet mutagenese. Etter hvert vil også selektiv hydrokarbonoksidasjon med "metal-organic framework" (MOF) være på agendaen. Det eksisterer allerede flere MOF basert på histidine brace motivet med kobber koordinert av nitrogen ligander.

GOX systemet er ikke ferdig optimalisert mot LPMOen CBP21 og flere optimaliseringsforsøk bør gjennomføres. Veien videre når GOX systemet viser gode resultater mot CBP21, kan innebære GOX produsert  $H_2O_2$  i forsøk med hydrokarbonoksidasjon og kitin depolymerisering.



## 7 Referanser

- Asensio, J. L., Arda, A., Canada, F. J. & Jimenez-Barbero, J. (2013). Carbohydrate-aromatic interactions. *Accounts of Chemical Research*, 46 (4): 946-954.
- Baird, C. & Cann, M. (2008). *Environmental Chemistry*. 4 utg. New York: W. H. Freeman and Company.
- Balasubramanian, R., Smith, S. M., Rawat, S., Yatsunyk, L. A., Stemmler, T. L. & Rosenzweig, A. C. (2010). Oxidation of methane by a biological dicopper centre. *Nature*, 465 (7294): 115-119.
- Bhatnagar, A. & Sillanpää, M. (2009). Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater — A short review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 152 (1–2): 26-38.
- Bissaro, B., Rohr, A. K., Skaugen, M., Forsberg, Z., Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. (2016). Fenton-type chemistry by a copper enzyme: molecular mechanism of polysaccharide oxidative cleavage. *bioRxiv*.
- Borisova, A. S., Isaksen, T., Dimarogona, M., Kognole, A. A., Mathiesen, G., Varnai, A., Rohr, A. K., Payne, C. M., Sorlie, M., Sandgren, M., et al. (2015). Structural and Functional Characterization of a Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Substrate Specificity. *The Journal of Biological Chemistry*, 290 (38): 22955-22969.
- Cheng, W.-H. & Kung, H. H. (1994). *Methanol production and use*. New York: Marcel Dekker, INC.
- Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3 (9): 853-859.
- Eide, K. B., Stockinger, L. W., Lewin, A. S., Tøndervik, A., Eijsink, V. G. H. & Sørli, M. (2016). The role of active site aromatic residues in substrate degradation by the human chitotriosidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1864 (2): 242-247.
- ExpASy. *ProtParam tool*. Tilgjengelig fra: <http://web.expasy.org/protparam/> (lest 27.04.2017).
- Farrell, S. O. & Taylor, L. E. (2006). *Experiments in Biochemistry: A Hands-On Approach*. 2 utg. Belmont, California: Brooks/Cole Cengage Learning.
- Forsberg, Z., Mackenzie, A. K., Sørli, M., Røhr Å, K., Helland, R., Arvai, A. S., Vaaje-Kolstad, G. & Eijsink, V. G. H. (2014a). Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide

- monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America*, 111 (23): 8446-8451.
- Forsberg, Z., Rohr, A. K., Mekasha, S., Andersson, K. K., Eijsink, V. G., Vaaje-Kolstad, G. & Sorlie, M. (2014b). Comparative study of two chitin-active and two cellulose-active AA10-type lytic polysaccharide monooxygenases. *Biochemistry*, 53 (10): 1647-1656.
- Frandsen, K. E., Simmons, T. J., Dupree, P., Poulsen, J. C., Hemsworth, G. R., Ciano, L., Johnston, E. M., Tovborg, M., Johansen, K. S., von Freiesleben, P., et al. (2016). The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. *Nature Chemical Biology*, 12 (4): 298-303.
- Garcia-Bosch, I. & Siegler, M. A. (2016). Copper-Catalyzed Oxidation of Alkanes with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under a Fenton-like Regime. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 55 (41): 12873-12876.
- GE Healthcare Life Sciences. *HiLoad 16/600 Superdex 75 pg*. Tilgjengelig fra: [http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-no/products/AlternativeProductStructure\\_17412/28989333](http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-no/products/AlternativeProductStructure_17412/28989333) (lest 06.03.2017).
- GE Healthcare Life Sciences. *HiTrap DEAE Sepharose FF*. Tilgjengelig fra: [http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences/products/AlternativeProductStructure\\_17470/17505501](http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences/products/AlternativeProductStructure_17470/17505501) (lest 28.02.2017).
- GE Healthcare Life Sciences. *HiTrap Phenyl HP*. Tilgjengelig fra: [http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-no/products/AlternativeProductStructure\\_17434/17135101](http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-no/products/AlternativeProductStructure_17434/17135101) (lest 06.03.2017).
- GE Healthcare Life Sciences. *HiTrap SP HP*. Tilgjengelig fra: [http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-no/products/AlternativeProductStructure\\_17470/17115201](http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-no/products/AlternativeProductStructure_17470/17115201) (lest 06.03.2017).
- GE Healthcare Life Sciences. *PD MiniTrap G-25*. Tilgjengelig fra: [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28922529AB\\_20110831095410.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28922529AB_20110831095410.pdf) (lest 21.03.2017).
- Gortari, M. C. & Hours, R. A. (2013). Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16 (3).
- Grønnevik, H., Falstad, M. & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21 (9): 601-606.
- Guan, S. P., Mok, Y. K., Koo, K. N., Chu, K. L. & Wong, W. S. (2009). Chitinases: biomarkers for human diseases. *Protein & Peptide Letters*, 16 (5): 490-498.

- Hakemian, A. S. & Rosenzweig, A. C. (2007). The Biochemistry of Methane Oxidation. *Annual Review of Biochemistry*, 76 (1): 223-241.
- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J. & Javed, S. (2013). Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 5 (1): 21-29.
- Hamre, A. G., Eide, K. B., Wold, H. H. & Sorlie, M. (2015). Activation of enzymatic chitin degradation by a lytic polysaccharide monooxygenase. *Carbohydrate Research*, 407: 166-169.
- Harris, P. V., Welner, D., McFarland, K. C., Re, E., Navarro Poulsen, J.-C., Brown, K., Salbo, R., Ding, H., Vlasenko, E., Merino, S., et al. (2010). Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family. *Biochemistry*, 49 (15): 3305-3316.
- Hart, D. J. (2012). *Organic chemistry: a brief course*. 13 utg. Belmont, California: Brooks/Cole Cengage Learning.
- Hemsworth, G. R., Davies, G. J. & Walton, P. H. (2013). Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, 23 (5): 660-668.
- Hemsworth, G. R., Johnston, E. M., Davies, G. J. & Walton, P. H. (2015). Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Biomass Conversion. *Trends in Biotechnology*, 33 (12): 747-761.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kolstad, G., Sørli, M., Synstad, B., Vriend, G., Vårum, K. M. & Eijsink, V. G. H. (2006). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (48): 18089-18094.
- Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B. & Eijsink, V. G. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5 (1): 45.
- Isaksen, T., Westereng, B., Aachmann, F. L., Agger, J. W., Kracher, D., Kittl, R., Ludwig, R., Haltrich, D., Eijsink, V. G. & Horn, S. J. (2014). A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides. *The Journal of Biological Chemistry*, 289 (5): 2632-2642.
- Kadokawa, J.-I. (2013). Ionic Liquid as Useful Media for Dissolution, Derivatization, and Nanomaterial Processing of Chitin. *Green and Sustainable Chemistry*, 3 (2): 7.

- Kittl, R., Kracher, D., Burgstaller, D., Haltrich, D. & Ludwig, R. (2012). Production of four *Neurospora crassa* lytic polysaccharide monoxygenases in *Pichia pastoris* monitored by a fluorimetric assay. *Biotechnology for Biofuels*, 5 (1): 79.
- Kostylev, M. & Wilson, D. (2013). Two-Parameter Kinetic Model Based on a Time-Dependent Activity Coefficient Accurately Describes Enzymatic Cellulose Digestion. *Biochemistry*, 52 (33): 5656-5664.
- Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Felice, A. K., Breslmayr, E., Preims, M., Ludwicka, K., Haltrich, D., Eijsink, V. G. & Ludwig, R. (2016). Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science*, 352 (6289): 1098-1101.
- Kuusk, S., Sørli, M. & Väljamäe, P. (2017). Human Chitotriosidase Is an Endo-Processive Enzyme. *PLoS ONE*, 12 (1): e0171042.
- Lo Leggio, L., Simmons, T. J., Poulsen, J. C., Frandsen, K. E., Hemsworth, G. R., Stringer, M. A., von Freiesleben, P., Tovborg, M., Johansen, K. S., De Maria, L., et al. (2015). Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monoxygenase. *Nature Communications*, 6: 5961.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42 (Database issue): D490-495.
- Loose, J. S. M., Forsberg, Z., Fraaije, M. W., Eijsink, V. G. H. & Vaaje-Kolstad, G. (2014). A rapid quantitative activity assay shows that the *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA is an active lytic polysaccharide monoxygenase. *The Federation of European Biochemical Societies Letters*, 588 (18): 3435-3440.
- Miller, J. M. (2005). *Chromatography concepts and contrasts*. 2 utg. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Munz, D. & Strassner, T. (2015). Alkane C–H Functionalization and Oxidation with Molecular Oxygen. *Inorganic Chemistry*, 54 (11): 5043-5052.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. 5 utg. New York: W. H. Freeman and Company.
- Omega Bio-Tek. (2013). E.Z.N.A. ® Plasmid DNA Mini Kit I.
- PALL Life Sciences. (2010). Macrosep® Advance Centrifugal Devices.
- Patil, R. S., Ghormade, V. & Deshpande, M. V. (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (7): 473-483.
- Quinlan, R. J., Sweeney, M. D., Lo Leggio, L., Otten, H., Poulsen, J. C. N., Johansen, K. S., Krogh, K., Jørgensen, C. I., Tovborg, M., Anthonsen, A., et al. (2011). Insights into

- the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (37): 15079-15084.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31 (7): 603-632.
- Stockinger, L. W., Eide, K. B., Dybvik, A. I., Sletta, H., Varum, K. M., Eijsink, V. G., Tondervik, A. & Sorlie, M. (2015). The effect of the carbohydrate binding module on substrate degradation by the human chitotriosidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854 (10 Pt A): 1494-1501.
- Strømnes, A.-G. S. (2016). *Rollen til aromatiske residuer i det aktive setet under substratdegradering* NMBU. Upublisert manuskript.
- Synstad, B., Gaseidnes, S., Van Aalten, D. M., Vriend, G., Nielsen, J. E. & Eijsink, V. G. (2004). Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *European Journal of Biochemistry*, 271 (2): 253-262.
- Tharanathan, R. N. & Kittur, F. S. (2003). Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (1): 61-87.
- ThermoFisher. *One Shot® BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent E. coli*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C601003> (lest 09.03.2017).
- ThermoFisher. *One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C404010> (lest 21.04.2017).
- ThermoFisher. *Qubit® dsDNA BR Assay Kit*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32850> (lest 24.02.2017).
- Tymoczko J. L., Berg J. M. & Stryer L. (2013). *Biochemistry A Short Course*. 2 utg. New York: W.H. Freeman and Company.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M., Synstad, B. & Eijsink, V. G. (2005a). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (31): 28492-28497.
- Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Riemen, A. H., Eijsink, V. G. & van Aalten, D. M. (2005b). Crystal structure and binding properties of the *Serratia marcescens* chitin-binding protein CBP21. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (12): 11313-11319.
- Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z., Zhai, H., Sorlie, M. & Eijsink, V. G. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*, 330 (6001): 219-222.

- Vaaje-Kolstad, G., Bøhle, L. A., Gåseidnes, S., Dalhus, B., Bjørås, M., Mathiesen, G. & Eijsink, V. G. H. (2012). Characterization of the Chitinolytic Machinery of *Enterococcus faecalis* V583 and High-Resolution Structure of Its Oxidative CBM33 Enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 416 (2): 239-254.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sørli, M. & Eijsink, V. G. H. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* – a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 280 (13): 3028-3049.
- Venkatesan, J., Vinodhini, P. A., Sudha, P. N. & Kim, S. K. (2014). Chitin and chitosan composites for bone tissue regeneration. *Advances in Food and Nutrition Research*, 73: 59-81.
- Walton, P. H. & Davies, G. J. (2016). On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 31: 195-207.
- Waters. *ACQUITY UPLC BEH Amide Column*. Tilgjengelig fra: [http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186004801&locale=en\\_N](http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186004801&locale=en_N) (lest 09.03.2017).
- Westereng, B., Cannella, D., Wittrup Agger, J., Jørgensen, H., Larsen Andersen, M., Eijsink, V. G. H. & Felby, C. (2015). Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer. *Scientific Reports*, 5: 18561.
- Wong, C. M., Wong, K. H. & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78 (6): 927-938.



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway